INSTITUT FÜR **A**NGEWANDTE **L**ABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Alicyclobacillus Differentiation

- low MG -

Real-time Differenzierung von *Alicyclobacillus spp.*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* und *Alicyclobacillus acidocaldarius*

real-time PCR differentiation of *Alicyclobacillus spp.*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius*

REF: Q724

Version 01/26

GEN-IAL GmbH
Tel: 0049 2241 2522980
Fax: 0049 2241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

QuickGEN PCR Kit

Alicyclobacillus Differenzierung

1. Verwendungszweck

Nachweis und gleichzeitige Identifizierung von *Alicyclobacillus spp., Alicyclobacillus acidoterrestris* und *Alicyclobacillus acidocaldarius.*

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (HEX/DQ; FAM/DQ; ATTO/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (ROX/DQ) wird zusammen mit der spezifischen Sequenz in einem Reaktionsgefäß amplifiziert, um falsch negative Ergebnisse durch Inhibition auszuschließen.

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

1	x Premix	weißer Deckel
6	x Dye Strips (lyophilisiert, inkl. IC-DNA und Lyticase)	tube strips
6	x Cap Strips	
1	x ddH_2O	farbloser Deckel
1	x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH_2O gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilisierten Dye Strips und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren.
Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C, den Premix **nach Erhalt** bei -20 °C lagern.
Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 3x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollte deshalb der Premix aliquotiert werden.

Die Dye Strips enthalten die fluoreszenzmarkierten Sonden und sind lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollten sie nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 12 Monate haltbar.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für low profile PCR tubes
Zentrifuge passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße
Zentrifuge für Strips
Pipetten
„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH_2O)
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung muss die lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und in ddH_2O gelöst werden:

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH_2O aufnehmen
- 15 Minuten lösen lassen und gut mischen

Alle PCR-Komponenten vor Gebrauch gut mischen und kurz abzentrifugieren.

Die Folie von den benötigten tube strips entfernen und die PCR-Komponenten pipettieren. Nach dem Pipettieren die tube strips mit den mitgelieferten cap strips verschließen.

PCR-Ansatz:

PCR-Komponenten	**Menge (µL)**
Premix	15,0
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	**20,0**

* bei Verwendung des Simplex Easy DNA Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH_2O hinzufügen

1. Je 15,0 µL Premix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen
2. 5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben, für die PCR-Positivkontrolle 5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 5 µL und für die PCR-Negativkontrolle* 5 µL steriles ddH_2O pipettieren (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln).
3. Die PCR-Reaktionsgefäße sofort verschließen und kurz zentrifugieren.
4. Die PCR-Gefäße ins PCR-Gerät stellen und den Lauf starten.

Sehr wichtig: * Die PCR-Negativkontrolle bitte auf jeden Fall mit 5 µL ddH_2O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.

6.2 PCR-Programm

Software MyGo Pro/ ESR 3.5 / 3.6

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 sec	60 °C	

Advanced Settings MyGo Pro Integration time (s) 0.7

Advanced Settings MyGo Pro ESR Integration time (s) 1.0

7. Auswertung

Die Auswertung wird entsprechend der für das real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (siehe Herstellerangaben).

***Alicyclobacillus acidoterrestris*-DNA:** FAM-Kanal

***Alicyclobacillus spp.*-DNA:** HEX-Kanal

***Alicyclobacillus acidocaldarius*-DNA:** ATTO-Kanal

Inhibitionskontroll-DNA: ROX-Kanal

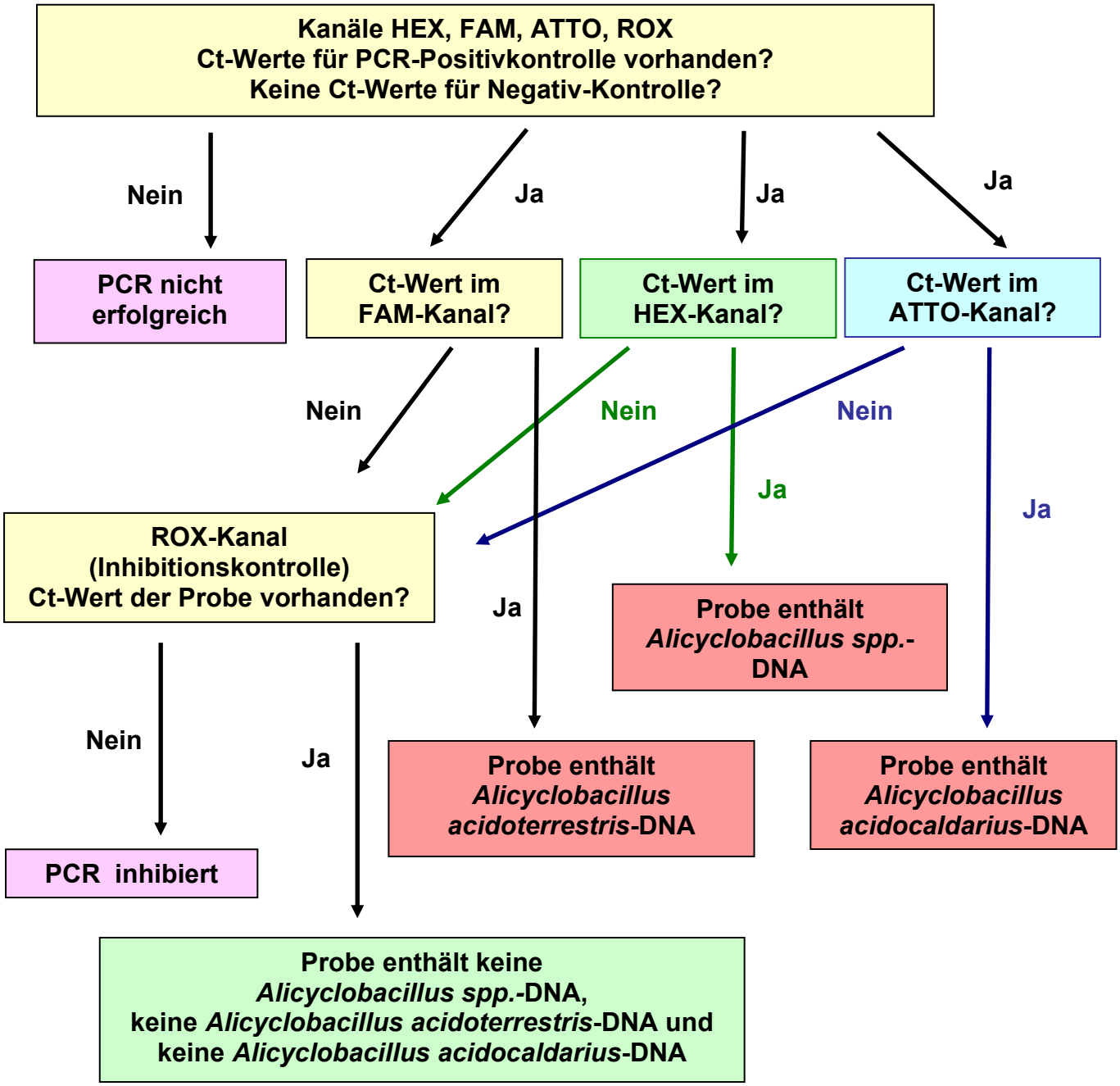
Eine Probe wird als ***Alicyclobacillus acidoterrestris*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als ***Alicyclobacillus spp.*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **HEX-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als ***Alicyclobacillus acidocaldarius*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ATTO-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn keine detektierbare Fluoreszenz in den verschiedenen Kanälen vorliegt und die Positivkontrollen eindeutig positiv sind. Die Negativkontrollen sind eindeutig negativ. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durch inhibitorische Einflüsse muss die Inhibitionskontrolle in der Probe und in den Negativkontrollen positiv sein.

Analysediagramm



Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. GEN-IAL übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht. Rechtlicher Hinweis: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist patentrechtlich geschützt und somit lizenzpflichtig. Sie ist im Besitz der Hoffman-La Roche Inc. Diese Produktinformation versteht sich nicht als Autorisierung oder Lizenzierung, die PCR-Methode kommerziell anzuwenden.

QuickGEN PCR Kit

Alicyclobacillus Differentiation

1. Intended use

Qualitative detection and differentiation of *Alicyclobacillus spp., Alicyclobacillus acidoterrestris and Alicyclobacillus acidocaldarius*.

2. Test principle

The (TaqMan®) real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; ATTO/DQ; HEX/DQ) which, when accurately hybridised, emit a measurable fluorescent signal of a defined wavelength in the extension phase. The increase of signal is continuously measured in a real-time PCR detection instrument. To avoid false negative PCR-results an Inhibition control (ROX/DQ) is amplified together in one reaction vessel with the specific sequence.

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 PCR reactions:

1	x Premix	white cap
6	x Dye Strips (freeze-dried, incl. IC-DNA and lyticase)	tube strips
6	x Cap Strips	
1	x ddH_2O	colourless cap
1	x Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

4. Storage

The Control-DNA is lyophilized and has to be solved in ddH_2O prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized Dye Strips and lyophilized Control-DNA.
The PCR-reagents should be stored at 2 – 8 °C (35 – 46 °F).
Keep Premix for storage at - 20 °C (- 4 °F) **after arrival**. Avoid loss of sensitivity by repeating freezing and thawing more than 3 times. For irregular use aliquot the Premix.

The Dye Strips contain the fluorescent labelled probes and should be handled light protected.

All reagents are stable for 12 months, if they are stored correctly.

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

Real-time PCR instrument for low profile tubes
Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes
Centrifuge for strips
Pipettes
“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH_2O
sterile filter tips

6. PCR

6.1. PCR-Setup

When using the kit for the first time, the freeze-dried Control-DNA has to be shortly centrifuged and carefully resolved:

- add 55 µL sterile ddH_2O to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

Before every use thoroughly mix all PCR components and centrifuge briefly.

Remove the film from the needed tube strips and pipette the PCR-Components. After pipetting close the tube strips with the provided cap strips.

PCR-reaction Setup:

PCR-Components	**volume (µL)**
Premix	15.0
Sample-DNA	5.0*
Total volume	**20.0**

* if using the Simplex easy DNA kit: add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH_2O

1. Pipette 15 µL of the Premix into each PCR-tube, making sure that, prior to the first filling, the tip has been moistened.
2. Add 5 µL sample DNA, add 5 µL of the Control-DNA for the positive control reaction, add 5 µL of the extraction control and 5 µL of ddH_2O for the negative control* reaction. Use a fresh tip with each DNA filling.
3. Close the tubes immediately and centrifuge them shortly.
4. Place the tubes in the PCR-machine and start run.

Very important: * Please fill up the negative control with 5 µL ddH_2O to avoid unspecific amplification.

Work swiftly to avoid warming up and keep away from light.

6.2 PCR-Program

Software MyGo Pro/ ESR 3.5 / 3.6

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 sec	60 °C	

Advanced Settings MyGo Pro Integration time (s) 0.7

Advanced Settings MyGo Pro ESR Integration time (s) 1.0

7. Evaluation

The evaluation has to be made according to the data analysis programme recommended by the real-time instrument manufacturer.

Alicyclobacillus acidoterrestris*-DNA*: FAM-channel

***Alicyclobacillus spp.*-DNA:** HEX-channel

Alicyclobacillus acidocaldarius*-DNA*: ATTO-channel

Inhibition Control-DNA: ROX-channel

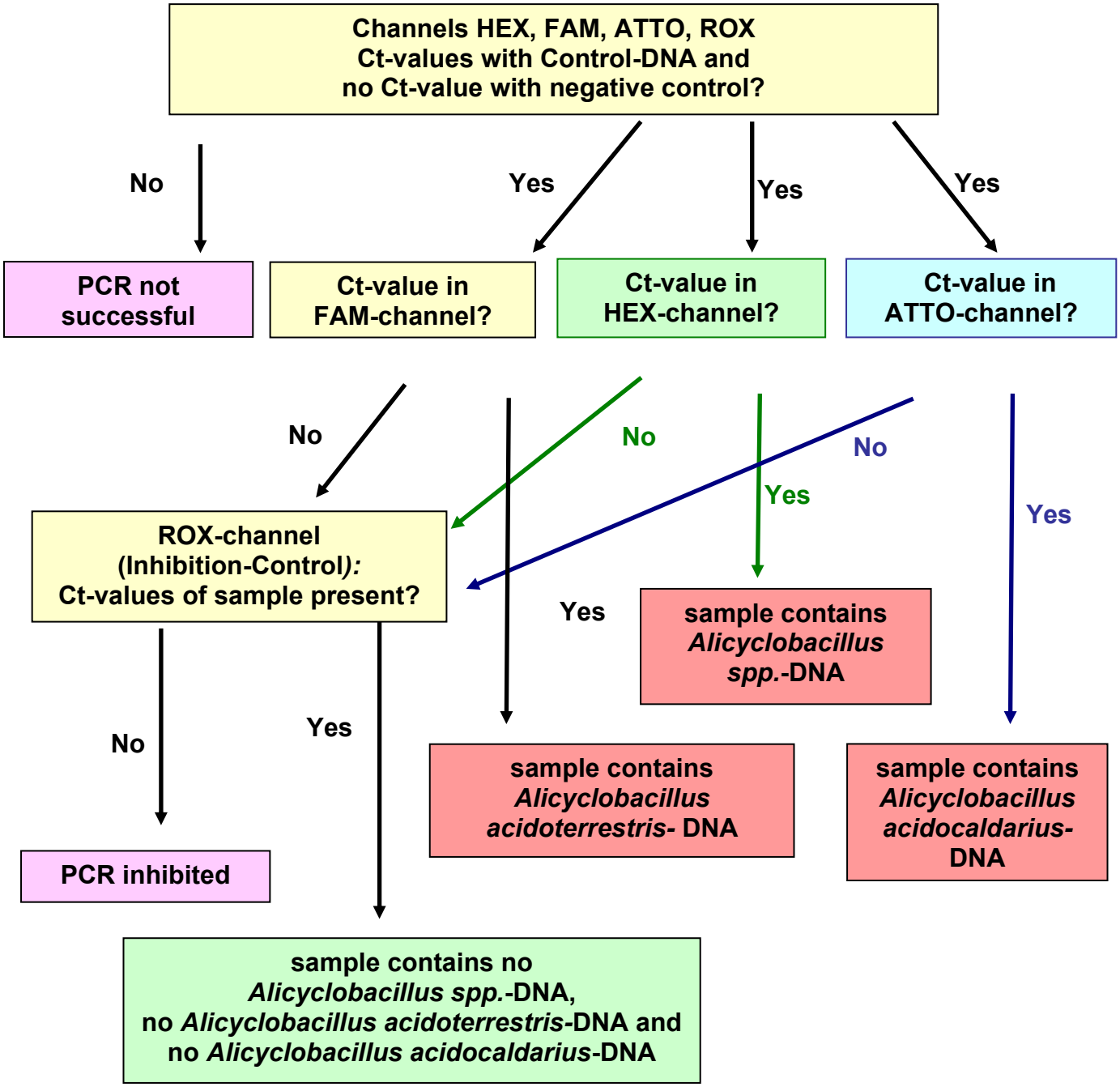
A sample is ***Alicyclobacillus acidoterrestris*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

A sample is ***Alicyclobacillus spp.*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **HEX-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

A sample is ***Alicyclobacillus acidocaldarius*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **ATTO-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

A sample is negative, if there is no detectable fluorescence increase in the different channels and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification. The Inhibition Control in the ROX-channel has to be positive in the sample and in the negative controls, a false negative result due to inhibitory effects is then excluded.

analysis flowchart



Note:
The polymerase-chain reaction (PCR) is protected by patents and requires a licence from Hoffmann-LaRoche Inc.. The provided product does not authorise the purchaser for the commercial use of this method.
GEN-IAL makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, GEN-IAL will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. GEN-IAL shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.