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

QuickGEN PCR Kit

Alicyclobacillus Differentiation

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

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

REF: Q725

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 Differenzierung von *Alicyclobacillus spp., Alicyclobacillus acidoterrestris* und *Alicyclobacillus acidocaldarius.*

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt durch Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; Cy5/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 50 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x	Premix	weißer Deckel
1 x	Dye Mix (lyophilisiert, inkl. IC-DNA)	dunkles Gefäß, roter Deckel
1 x	ddH_2O	farbloser Deckel
1 x	Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerung

Der Dye Mix mix und die Control-DNA werden lyophilisiert geliefert und müssen vor Gebrauch in ddH_2O gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Den lyophilisierten Dye Mix und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren.
Die PCR-Reagenzien und die gelöste Control-DNA 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.

Der Dye Mix (roter Verschluss) enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollte er nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 12 Monate haltbar.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte:

Real-time Gerät mit den Kanälen FAM, HEX, ROX und CY5
Zentrifuge passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße
Zentrifuge für PCR-Platten oder Strips
Pipetten
„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien:

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH_2O)
sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL
PCR-Platten / Strips incl. Folien / Deckel
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)
Colour Compensation Set für LC480 (GEN-IAL®, REF: Q800)

LC480: Colour Compensation vor der ersten Benutzung des Kits durchführen

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung müssen alle lyophilisierten Komponenten kurz zentrifugiert und in ddH_2O gelöst werden:

- den lyophilisierten Dye Mix in 80 µL ddH_20 aufnehmen
- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH_2O aufnehmen
- 15 Minuten lösen

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

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	**Menge (µL)**
Premix	13,5
Dye Mix	1,5
Proben-DNA	5,0
Gesamtvolumen	**20,0**

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

1. Den Mastermix aus Premix und Dye Mix herstellen.
2. Multipliziere die oben angegebenen Volumina mit der Anzahl PCR-Reaktionsansätze, inklusive aller Kontrollen (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle), unter Berücksichtigung einer Pipettierreserve von ca. 5-10 % .
3. Je 15,0 µL Mastermix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen.
4. 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).
5. Die PCR-Reaktionsgefäße sofort verschließen und kurz zentrifugieren.
6. 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

6.2.1 Programmierung und PCR-Programm LC480

1. Im Fenster ***LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP1*** das Werkzeugsymbol: Schraubenschlüssel in der rechten Leiste anklicken
2. Auf der linken Seite den Button ***Detection formats*** anklicken
3. Im Fenster ***Detection formats New*** anklicken und dem Experiment einen Namen geben
4. Im Fenster ***Filter Combination Selection*** die folgenden Filterkombinationen ankreuzen 465-510 / 533-580 / 533-610 / 618-660
5. Im Fenster ***Selected Filter Combination*** List folgende Werte eingeben:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt factor	Quant fact	Max. Integ. Time
465	510	465-510 FAM	1	10	2
533	580	533-580 HEX	1	10	2
533	610	533-610 610	1	10	2
618	660	618-660 660	1	10	2

6. Schließen des Fensters durch Anklicken des Buttons ***Close***
7. Auf der rechten Seite Button **New Experiment** anklicken
8. Aus dem pull-down Menü der Leiste ***Detection formats*** das entsprechende Experiment auswählen, den Button ***Customize*** anklicken und die Detektionsformate überprüfen. Alle müssen aktiviert sein.
9. Klicken des ***OK*** buttons
10. Folgendes Programm schreiben:

1. Programm Name: ***Heat***

   Cycles **1** Analysis Mode ***None***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: ***Ampli***

   Cycles **40** Analysis Mode ***Quantification***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.40		0	0	0
60	Single	00:00:25	2.20		0	0	0

3. Programm Name *:* ***Cool***

   Cycles **1** Analysis Mode ***None***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:20	2.20		0	0	0

Optional: Einspeichern des Programms als ***run template***:
Unten links den Haken neben dem Button ***Apply Template*** anklicken und ***Save as template*** abspeichern, Lauf in den ***template Ordner*** speichern
Für spätere Wiederholungen steht das Programm nun im ***New Experiment from template*** zur Verfügung.

11. Links den Button ***Subset editor*** anklicken
12. Den Button **+** anklicken und ***New Subset 1*** erscheint
13. Mit der Strg Taste die entsprechenden wells im ***New Subset 1 Settings*** Fenster anklicken
14. Den Button ***Apply*** anklicken
15. In der linken Leiste den Button ***Sample editor*** anklicken
16. **Ganz wichtig:** Oben in der Leiste ***Step 1 Select Workflow: Abs.Quant*** ankreuzen
17. In der Leiste ***Step 2 Select Samples*** das Subset ***New Subset*** auswählen
18. Proben in der Tabelle eingeben

19. In der linken Leiste den Button ***Experiment*** anklicken und mit ***Start run*** den Lauf starten

6.2.2 PCR-Programm für andere real-time Geräte

Im Premix befindet sich kein ROX. Dies muss teilweise bei der Einstellung der gerätespezifischen Software vor dem Lauf berücksichtigt werden. **ABI 7500**: Unter “Assign Targets and Samples” in `Select the dye to use as the passive reference´ „none“ auswählen.

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	25 – 30* sec	60 °C	

*** wenn das PCR-Gerät eine Programmierung von 25 sec zulässt, dann bitte diese Zeit einstellen**

7. Auswertung

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

Für LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

***Alicyclobacillus acidoterrestris*-DNA**: FAM-Kanal (LC480: 465-510)
***Alicyclobacillus spp.*-DNA:** HEX-Kanal (LC480: 533-580)
***Alicyclobacillus acidocaldarius*-DNA:** CY5-Kanal (LC480: 610-660)
Inhibitionskontroll-DNA: ROX-Kanal (LC480: 533-610)

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 DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

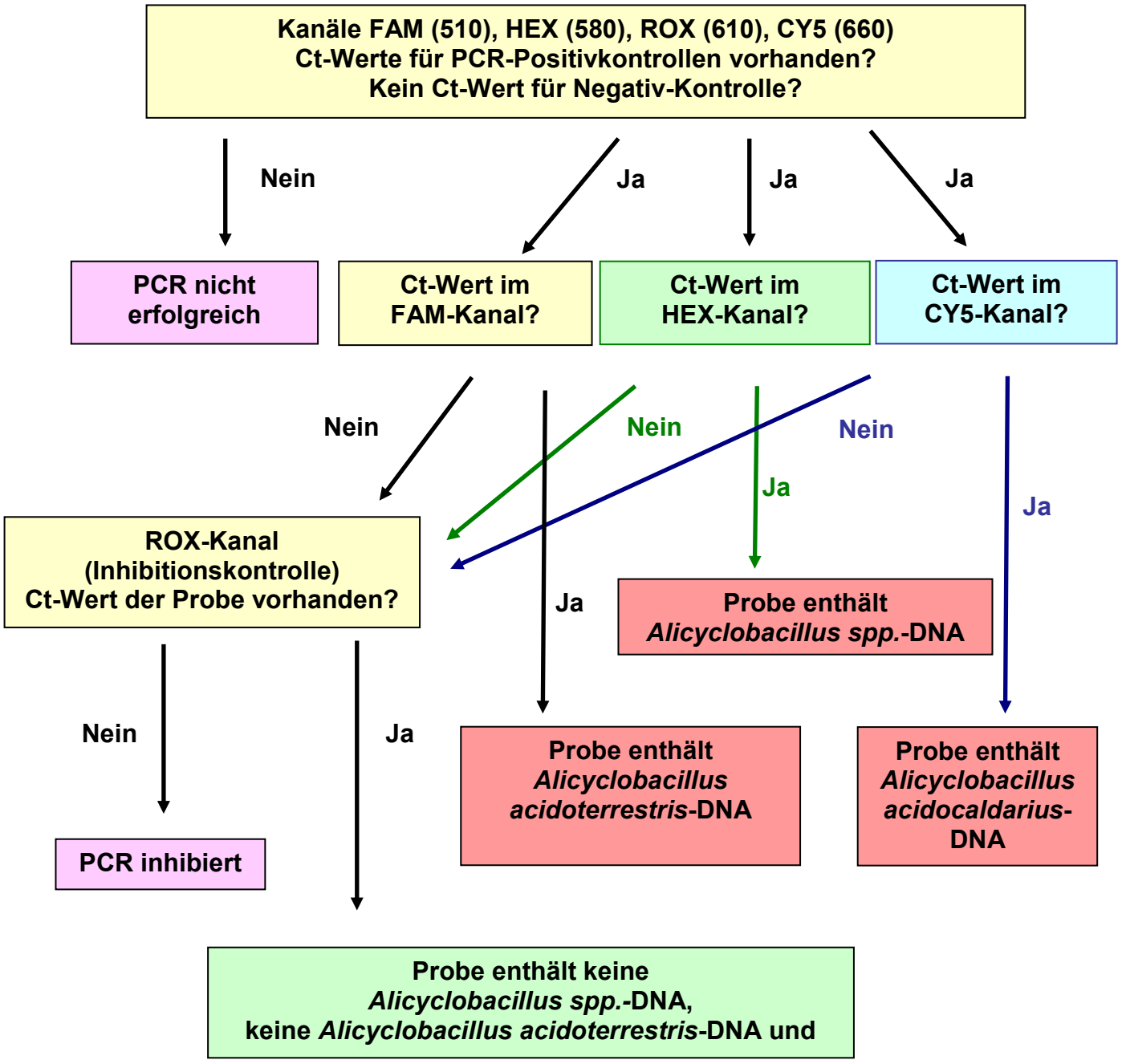
Eine Probe wird als ***Alicyclobacillus spp.*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **HEX-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der 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 **CY5-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 im ROX-Kanal positiv sein.

Analysediagramm

LC480: Auswertung nach ausgeführter Colour Compensation



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; HEX/DQ; CY5/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 50 PCR reactions.

1 x	Premix	white cap
1 x	Dye Mix (freeze-dried, incl. IC-DNA)	dark vial, red cap
1 x	ddH_2O	colourless cap
1 x	Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

4. Storage conditions

The Dye Mix and the Control-DNA are freeze-dried, they have to be solved in ddH_2O prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized Dye Mix and lyophilized Control-DNA.

The PCR reagents and the solved Control-DNA 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 mix 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 für FAM, HEX, ROX and CY5 channels
Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes
Centrifuge for multiwell plates or stripes
Pipettes
“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH_2O
sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL
sterile optical tubes, plates, capillaries, strips
sterile filter tips
Colour Compensation Set for LC480 (GEN-IAL®, REF Q800)

LC480: Use a Colour compensation prior to first use of the kit

6. PCR

6.1. PCR-Setup

When using the kit for the first time, the freeze-dried kit components have to be shortly centrifuged and carefully resolved:

- add 80 µL sterile ddH_2O to freeze-dried Dye Mix
- 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.

PCR-reaction Setup:

PCR-components	**amount (µL)**
Premix	13.5
Dye Mix	1.5
Sample-DNA	5.0
Total volume	**20.0**

* if using the Simplex Easy Kit: add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH_2O

1. Prepare a mastermix by mixing Premix and Dye Mix
2. Multiply said volumes with the number of PCR preparations including controls (positive control, negative control, extraction control), taking into account pipette reserves of approximately 5-10 %.
3. Divide 15.0 µL of the PCR-mastermix among the individual reaction vessels, making sure that, prior to the first filling, the tip of the pipette has been moistened.
4. Add 5 µL sample DNA, add 5 µL of the Control-DNA for the PCR positive control, 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.
5. Close the tubes immediately and centrifuge them shortly.
6. 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

6.2.1 PCR-Program LC480

1. Click the button ***tool*** on the right side in the window ***LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP1***
2. Click the button ***Detection formats*** at the left side of the menu bar
3. Click ***New*** in the window ***Detection formats*** and name the experiment
4. Open the window ***Filter Combination Selection*** and choose the following filter combinations: 465-510 / 533-580 / 533-610 / 618-660.
5. Open the window ***Selected Filter Combination*** list and add the following amounts

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt factor	Quant factor	Max. Integ. Time
465	510	465-510 Fam	1	10	2
533	580	533-580 Hex	1	10	2
533	610	533-610 610	1	10	2
618	660	618-660 660	1	10	2

6. ***Close*** the window
7. Click the button ***New Experiment*** on the right side of the menu bar
8. From the pull-down menue ***Detection formats*** choose the defined experiment, click the button ***Customize*** and check the detection formats. All of them have to be activated
9. Click the button **ok**
10. Define the following program:

1. Program Name: ***Heat***

   Cycles **1** Analysis Mode ***None***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Program Name: ***Ampli***

   Cycles **40** Analysis Mode ***Quantification***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.40		0	0	0
60	Single	00:00:25	2.20		0	0	0

3. Program name : ***Cool***

   Cycles **1** Analysis Mode ***None***

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:20	2.20		0	0	0

Optional: Saving the program as ***run template***. The template button allows to select and apply a template to the currently open object and to save the currently open object as a template. Click the clamp beside the button ***Apply Template***. Click ***Save as template*** and save the file in ***templates.***

11. Click the button ***Subset editor*** on the left side
12. Click the button **+** and ***New Subset 1*** appears
13. Mark the wells in the ***New Subset 1 Settings*** window
14. Click the button ***Apply***
15. Click the button ***Sample editor*** on the left side
16. **Very important:** Activate In the window ***Step 1 Select Workflow: Abs.Quant***
17. Choose the subset ***New Subset*** in the window ***Step 2 Select Samples***
18. Define your probes in the ***Sample table***
19. Switch to the button ***Experiment*** and start the run with the button ***start run***

6.2.2 PCR program for other real-time machines

The Premix contains no ROX. This must be considered according to the settings of the real-time machine. **ABI 7500:** Under “Assign Targets and Samples” in `Select the dye to use as the passive reference´ choose „none“.

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	25 – 30* sec	60 °C	

***please program 25 sec, if the real-time-PCR machine allows it**

7. Evaluation

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

For LC480: Activate Colour Compensation

***Alicyclobacillus acidoterrestris*-DNA**: FAM-channel (LC480: 465-510)
***Alicyclobacillus spp.*-DNA:** HEX-channel (LC480: 533-580)
***Alicyclobacillus acidocaldarius*-DNA:** CY5-channel (LC480: 610-660)
Inhibition Control-DNA: ROX-channel (LC480: 533-610)

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 inibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

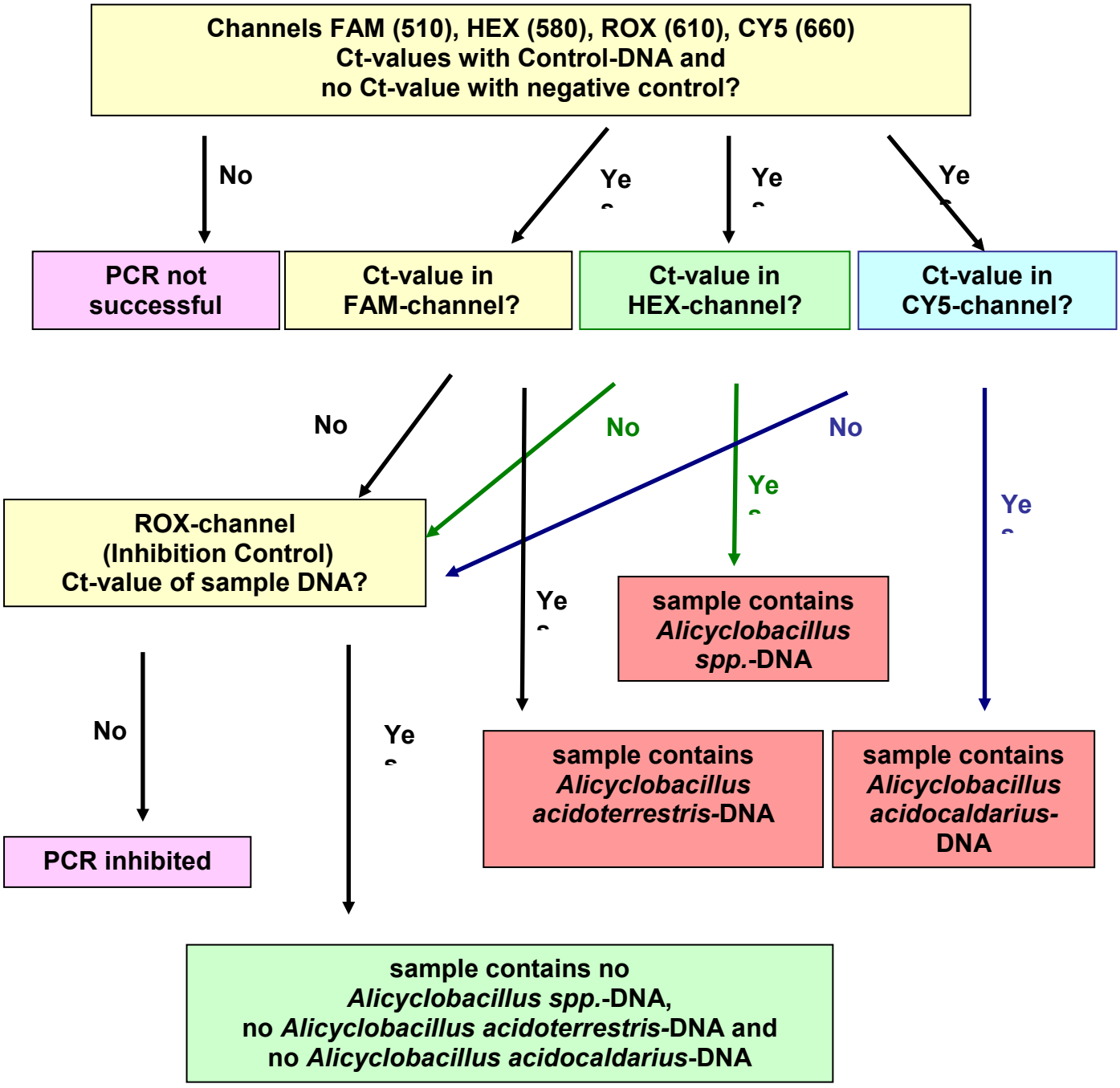
A sample is ***Alicyclobacillus spp.*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **HEX-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or negative (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 **CY5-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

LC480: analysis after activating Colour Compensation



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