



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN First-Beer PCR Kit

P1 Taqman[®] Screening
(without yeast detection)

Real-time PCR Kit zum Nachweis von
bierschädlichen Bakterien

real-time PCR Kit for detection of
beer spoilage bacteria

Art. Nr. / Order No.: QPP1ToH 0048 white

Version 02/18

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

QuickGEN First-Beer PCR Kit

P1 TaqMan[®] Screening ohne Hefen

Art. Nr.: QPP1ToH 0048 white

(Version 02/18)

1. Beispiele erfolgreich nachgewiesener Mikroorganismen

Bakterien

- Lactobacillus spp.
- L. acetotolerans
- L. acidophilus
- L. amylolyticus
- L. amylovorus
- L. backii
- L. brevis
- L. brevisimilis
- L. buchneri
- L. casei / paracasei
- L. collinoides / paracollinoides
- L. coryniformis ssp. coryniformis
- L. coryniformis ssp. torquens
- L. curvatus
- L. delbrückii ssp. delbrückii/ lactis
- L. harbinensis
- L. helveticus
- L. johnsonii
- L. lindneri
- L. malefermentans
- L. parabrevis
- L. parabuchneri (frigidus)
- L. paucivorans
- L. pentosus
- L. perolens
- L. plantarum
- L. paraplantarum
- L. rossiae
- Lactococcus lactis
- Megasphaera spp.
- Micrococcus kristinae
- Pectinatus spp.
- Pectinatus cerevisiophilus
- Pectinatus frisingensis
- Pectinatus haikarae
- Pectinatus ssp.
- Pediococcus spp.
- Pediococcus acidilactici
- Pediococcus damnosus
- Pediococcus dextrinicus
- Pediococcus inoptinatus
- Pediococcus pentosaceus
- Pediococcus parvulus
- Pediococcus claussenii

2. Verwendungszweck

Nachweis von bakteriellen Kontaminationen in Bier und Biermischgetränken.

3. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (FAM/DQ; ROX/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (HEX/DQ) wird zusammen mit der spezifischen Sequenz in einem Reaktionsgefäß amplifiziert, um falsch negative Ergebnisse durch Inhibition auszuschließen. Die PCR-Systeme enthalten dUTP, welches bei der Elongation zum Teil das dTTP ersetzt. Die Verwendung von Uracil-N-Glycosylase (UNG) eliminiert alle dUMP enthaltenden Amplikons, die aus eventuellen Kontaminationen früherer PCRs stammen könnten. (Das UNG Enzym ist in diesem Kit nicht enthalten).

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

| | |
|--|------------------|
| 1 x Premix QPP1ToH | weißer Deckel |
| 48 x QPP1ToH mix (lyophilisiert, inkl. IK-DNA) | tube strips |
| 6 x cap strips | |
| 1 x ddH ₂ O | farbloser Deckel |
| 1 x Control-DNA (lyophilisiert) | gelber Deckel |

5. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH₂O gelöst werden (siehe Punkt 7.1).

Den lyophilisierten QPP1ToH mix und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren.

Alle Reagenzien bis auf den Premix bei 4 – 8 °C lagern.

Den Premix 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 QPP1ToH mix enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollte er nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 6 Monate haltbar.

6. Zusätzlich erforderliches Material

6.1. Geräte

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

6.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH₂O)
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)
optional: Uracil N-Glycosylase (0,01 U/μL PCR-Reaktion)
Colour Compensation Set für LC480 (GEN-IAL[®], PP1T CC LC480 0005)

LC480: Colour Compensation vor der ersten Benutzung des Kits durchführen.

7. PCR

7.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung muss die lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und in ddH₂O gelöst werden:

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH₂O aufnehmen
- 15 Minuten lösen

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 pro Probe:

| PCR-Komponenten | Menge (µL) |
|-----------------|-------------|
| Premix QPP1ToH | 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 ddH₂O 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 ddH₂O 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 ddH₂O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.

7.2 PCR-Programm

7.2.1 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 z.B. QPP1ToH
4. Im Fenster **Filter Combination Selection** die folgenden Filterkombinationen ankreuzen: 465-510 / 533-580 / 533-610
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 |

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 **35** 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 | 00:00:10 | 4.40 | | 0 | 0 | 0 |
| 60 | Single | 00:00:20 | 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

8. Auswertung

Die Auswertung wird entsprechend der für das Real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (siehe Herstellerangaben). Falls die automatische Datenanalyse nicht zufriedenstellend ist, kann die threshold manuell über die Hintergrundfluoreszenz gehoben werden.

Für LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

***Lactobacillus/ Pediococcus*-DNA:** FAM-Kanal (LC480: 465-510)

***Megasphaera/ Pectinatus*-DNA:** ROX-Kanal (LC480: 533-610)

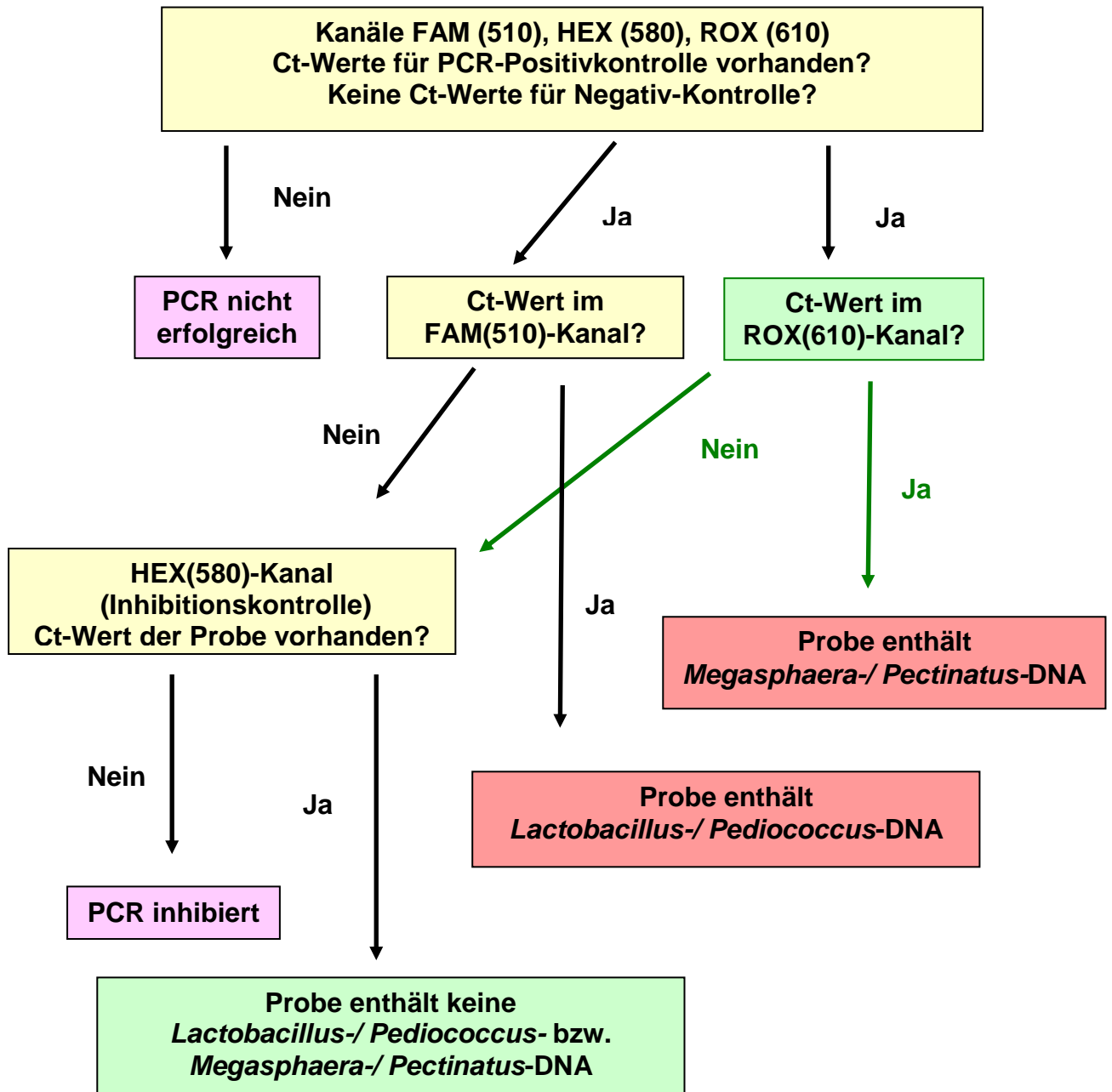
Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal (LC480: 533-580)

Eine Probe wird als ***Lactobacillen/Pediococcen* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal (LC480: 465-510)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal (LC480: 533-580) 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 ***Megasphaera/Pectinatus* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ROX-Kanal (LC480: 533-610)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal (LC480: 533-580) 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 First-Beer PCR Kit

P1 TaqMan[®] Screening without yeast

Order No.: QPP1ToH 0048 white

(Version 02/18)

1. Examples of successful detected microorganisms

Bacteria

- Lactobacillus spp.
 - L. acetotolerans
 - L. acidophilus
 - L. amylolyticus
 - L. amylovorus
 - L. backii
 - L. brevis
 - L. brevisimilis
 - L. buchneri
 - L. casei / paracasei
 - L. collinoides / paracasei
 - L. coryniformis ssp. coryniformis
 - L. coryniformis ssp. torquens
 - L. curvatus
 - L. delbrückii ssp. delbrückii/ lactis
 - L. harbinensis
 - L. helveticus
 - L. johnsonii
 - L. lindneri
 - L. malefermentans
 - L. parabrevis
 - L. parabuchneri (frigidus)
 - L. paucivorans
 - L. pentosus
 - L. perolens
 - L. plantarum
 - L. paraplantarum
 - L. rossiae
- Lactococcus lactis
- Megasphaera spp.
- Micrococcus kristinae
- Pectinatus spp.
 - Pectinatus cerevisiiphilus
 - Pectinatus frisingensis
 - Pectinatus haikarae
 - Pectinatus ssp.
- Pediococcus spp.
 - Pediococcus acidilactici
 - Pediococcus damnosus
 - Pediococcus dextrinicus
 - Pediococcus inoptinatus
 - Pediococcus pentosaceus
 - Pediococcus parvulus
 - Pediococcus claussenii

2. Intended use

Qualitative detection of bacterial contaminations in beer and beer mixes.

3. Test principle

The TaqMan[®] real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; ROX/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 (HEX/DQ) is amplified together in one reaction vessel with the specific sequence. The system contains dUTP. Optional: the use of Uracil-N-Glycosylase will eliminate any contamination with Uracil containing amplicons from former PCRs (the enzyme is not part of this kit).

4. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 PCR reactions:

| | |
|---|----------------|
| 1 x Premix QPP1ToH | white cap |
| 48 x QPP1ToH mix (freeze-dried, incl. IC-DNA) | tube strips |
| 6 x cap strips | |
| 1 x ddH ₂ O | colourless cap |
| 1 x Control-DNA (freeze-dried) | yellow cap |

5. Storage conditions

The Control-DNA is freeze-dried and has to be solved in ddH₂O prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized QPP1ToH mix and lyophilized Control-DNA.

All PCR reagents, except the Premix should be stored at 4 – 8 °C (39 – 46 °F).

Keep Premix for storage at - 20 °C (- 4 °F). Avoid loss of sensitivity by repeating freezing and thawing more than 3 times. For irregular use aliquot the Premix.

The QPP1ToH mix contains the fluorescent labelled probes and should be handled light protected.

All reagents are stable for 6 months, if they are stored correctly

6. Materials required, but not provided

6.1. Instruments

Real-time PCR instrument for low profile tubes white

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

6.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

sterile filter tips

optional: Uracil N-Glycosylase (0.01 U/μL added to the PCR reaction)

Colour Compensation Set for LC480 (GEN-IAL[®], PP1T CC LC480 0005)

LC480: Use a Colour compensation prior to first use of QPP1ToH Kit

7. PCR

7.1. 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 ddH₂O 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 QPP1ToH | 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 ddH₂O

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 ddH₂O 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 ddH₂O to avoid unspecific amplification.

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

7.2 PCR-Program

7.2.1 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, for example: QPP1ToH
4. Open the window **Filter Combination Selection** and choose the following filter combinations: 465-510 / 533-580 / 533-610
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 |

6. **Close** the window
7. Click the button **New Experiment** on the right side of the menu bar
8. From the pull-down menu **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 **35** 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 | 00:00:10 | 4.40 | | 0 | 0 | 0 |
| 60 | Single | 00:00:20 | 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**

8. Evaluation

The evaluation has to be made according to the data analysis program recommended by the real-time instrument manufacturer. If the automatic data analysis of the completed run is not satisfying, the threshold can be adjusted manually above the background signals in the fit point analysis.

LC480: For analysis activate Colour Compensation

***Lactobacillus/ Pediococcus*-DNA:** FAM-channel (LC480: 465-510)

***Megasphaera/ Pectinatus*-DNA:** ROX-channel (LC480: 533-610)

Inhibition Control-DNA: HEX- or JOE-channel (LC480: 533-580)

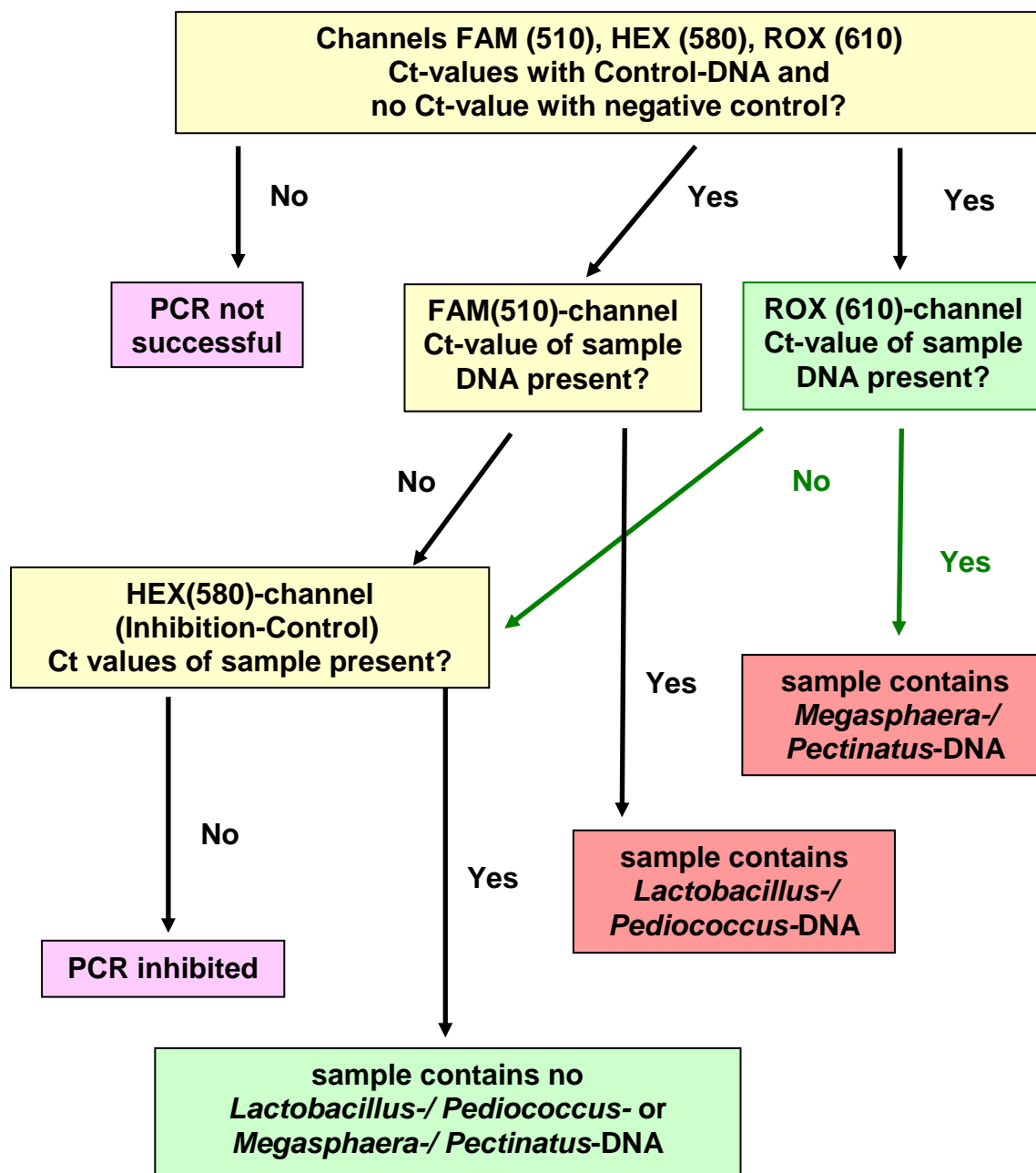
A sample is ***Lactobacillus/Pediococcus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel (LC480: 465-510)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the HEX- or JOE-channel (LC480: 533-580) 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 ***Megasphaera/ Pectinatus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **ROX-channel (LC480: 533-610)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the HEX- or JOE-channel (LC480: 533-580) 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 HEX- or JOE-channel (LC480: 533-580) 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



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.