



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Yeast and bacteria differentiation

- white -

Real-time PCR Identifizierung und Differenzierung
getränkeschädlicher Bakterien und Hefen

real-time PCR detection and differentiation of
beverage spoilage bacteria and yeast

REF: Q073

Version 01/20

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

QuickGEN PCR Kit

Hefen und Bakterien Differenzierung

1. Verwendungszweck

Differenzierung von bierschädlichen Hefen und Bakterien in Bier und Biermischgetränken. Folgende Bakterien und Hefen werden differenziert:

Lactobacillen, *Pediococcen*, Essigsäurebakterien, *Enterobacteriaceae*, Untergärige Hefe, Obergärige Hefe und Fremdhefen.

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierter sequenzspezifischer Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; ROX/DQ), wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extension-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (ROX/DQ) wird zusammen mit der spezifischen Sequenz in einem Tube 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). **In den tubes 4, 5, 7 und 8 ist Lyticase bereits enthalten.**

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 96 Bestimmungen (24 Proben) durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
12 x Dye Strips (lyophilisiert, tubes 4, 5, 7 und 8 enthalten Lyticase)	tube strips
12 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O (für PCR-Negativkontrollen)	farbloser Deckel

4. Lagerung

Die lyophilisierten Dye Strips nicht einfrieren.

Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C, den Premix nach Anbruch 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 white

Zentrifuge für tube strips

Pipetten

„Vortex“

5.2 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 (GEN-IAL[®], REF: Q800)

LC480: Colour Compensation vor der ersten Benutzung des Kits durchführen

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Premix vor Gebrauch gut mischen und ggf. 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	15,0
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	20,0

* bei Verwendung des Simplex Easy DNA- oder QuickGEN Sample Preparation Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH₂O hinzufügen

Pipettierschema:

Tube 1*	Premix 15,0 µL	ddH ₂ O 5,0 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Negativkontrolle)
Tube 2*	Premix 15,0 µL	ddH ₂ O 5,0 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Positivkontrolle)
Tube 3*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 4*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 5*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 6*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL
Tube 7*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL
Tube 8*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL

* auf die Orientierung der Tubes achten. Vor Tube 1 befindet sich auf dem strip ein A und hinter Tube 8 ein H.

6.2 PCR-Programm

6.2.1 Programmierung und PCR-Programm für 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
5. Im Fenster **Selected Filter Combination** in der Liste folgende Werte eingeben:

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. 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. Im Integration Mode auf Manual wechseln und folgende Werte unter Integration Time (sec) einstellen:

Filter Combination	Integration Time (sec)
465 – 510 (465-510)	2
533 – 580 (533-580)	1.5
533 – 610 (533-610)	2

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)
37	None	00:15:00	4.40		0	0	0
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **30*-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	00:00:15	4.40		0	0	0
62	Single	00:00:20	2.20		0	0	0

* für vorangereicherte Proben 30 Zyklen programmieren

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

7. Auswertung

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

LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

Die in der Tabelle angegebene Negativkontrolle (NTC, Tube 1) muss negativ in den Kanälen FAM und HEX sein und positiv im Kanal ROX (Inhibitionskontrolle). Ist die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal negativ und/oder die Ergebnisse in den Kanälen FAM/HEX positiv, muss die PCR wiederholt werden.

Die in der Tabelle angegebenen Inhibitionskontrollen der Proben (Tube 4/7) müssen im ROX-Kanal positiv sein. Ist die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal negativ oder schwach positiv, deutet dies auf inhibitorische Komponenten oder eine zu hohe DNA-Menge im Reaktionsansatz hin. Die Probe sollte verdünnt wiederholt werden.

Die in der Tabelle angegebene Positivkontrolle (Tube 2) muss im FAM-Kanal positiv sein. Ist sie im FAM-Kanal negativ, muss die PCR wiederholt werden.

* Fremdhefe 1 detektiert:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Issotchenkia orientalis</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>S. cerevisiae</i> <i>var. diastaticus</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Torulasporea delbrückii</i>		

* Fremdhefe 2 detektiert:

<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Naumovozyma dairenensis</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>				

PCR-Auswertung:

auf die Orientierung der Tubes achten. Vor Tube 1 befindet sich auf dem strip ein A und hinter Tube 8 ein H.

Tube	Probe	FAM	HEX	ROX
1	NTC	-	-	Inhibitionskontrolle
2	PTC	Positivkontrolle	-	-
3	1	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
4	1	Fremdhefe 1*	Untergärige Hefe	Interne Kontrolle
5	1	Fremdhefe 2*	Obergärige Hefe	Essigsäurebakterien
6	2	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
7	2	Fremdhefe 1*	Untergärige Hefe	Interne Kontrolle
8	2	Fremdhefe 2*	Obergärige Hefe	Essigsäurebakterien

NTC: Negativkontrolle PTC: Positivkontrolle

Beispiel zur Auswertung:

Die Probe 1 zeigt ein positives FAM-Signal in Tube 4, dann handelt es sich um eine Fremdhefe 1*. Bei Mischungen können positive Signale in den entsprechenden Kanälen vorliegen.

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

Yeast and bacteria differentiation

1. Intended use

Differentiation of beer spoilage bacteria and yeast in beer and beer mixing drinks.

The following bacteria and yeasts are differentiated:

Lactobacilli, *Pediococci*, Acetic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, Bottom-fermented yeast, Top-fermented yeast and wild yeast.

2. Test principle

The TaqMan® real-time PCR is based on hot-start PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; HEX/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 is amplified together in one tube 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). **Tubes 4, 5, 7 and 8 contain lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 96 PCR reactions (24 samples):

1 x Premix	white cap
12 x Dye Strips (freeze-dried, tubes 4, 5, 7 und 8 contain lyticase)	tube strips
12 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O (for PCR negative controls)	colourless cap

4. Storage conditions

Do **not** freeze the lyophilized Dye Strips. The PCR reagents should be stored at 2 - 8 °C (35 – 46 °F). Keep Premix for storage at - 20 °C (- 4 °F) after opening. 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 machine for low profile PCR tubes white

Centrifuge for tube strips

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

sterile filter tips

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

Colour Compensation Kit (GEN-IAL, REF: Q800)

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

6. PCR

6.1. PCR-Setup

Before every use thoroughly mix Premix 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	Amount (µL)
Premix	15.0
Sample-DNA	5.0*
Total volume	20.0

* if using the Simplex easy DNA- or QuickGEN Sample Preparation Kit:

add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH₂O

Pipetting scheme:

Tube 1*	Premix 15.0 µL	ddH ₂ O 5.0 µL, Attention: pipette no sample-DNA (negative control)
Tube 2*	Premix 15.0 µL	ddH ₂ O 5.0 µL, Attention: pipette no sample-DNA (positive control)
Tube 3*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 4*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 5*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 6*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL
Tube 7*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL
Tube 8*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL

* please notice the orientation of the tubes. They are marked on the strip at Tube 1 with an A and at Tube 8 with an H.

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
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. In the Integration Time Mode choose Manual and define the following amounts for Integration Time:

Filter Combination	Integration Time (sec)
465 – 510 (465-510)	2
533 – 580 (533-580)	1.5
533 – 610 (533-610)	2

9. Choose **ok**
10. Write the following program:

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)
37	None	00:15:00	4.40		0	0	0
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **30*-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	00:00:15	4.40		0	0	0
62	Single	00:00:20	2.20		0	0	0

* for preenriched samples program 30 cycles

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: 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**

7. Evaluation

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

The negative control (NTC, tube 1) has to be negative in the FAM-, and HEX-channel and positive in the ROX-channel (Inhibition Control). Is the Inhibition Control in the ROX-channel negative and/or the results in the FAM-/ HEX-channel positive, PCR has to be repeated.

The Inhibition Controls in the samples (tubes 4/7) have to be positive in the ROX-channel. Is the Inhibition Control in the ROX-channel negative or weak inhibitors or high amount of DNA are in the sample reaction. The sample should be repeated with a dilution.

The Positive Control (tube 2) has to be positive in the FAM-channel, if it is negative PCR, has to be repeated.

* Wild yeast 1 detects:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Issotchenkia orientalis</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Metschnikowia pulcherrina</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>S. cerevisiae</i> <i>var. diastaticus</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Torulaspota delbrückii</i>		

* Wild yeast 2 detects:

<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida kefir</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Naumovozyma dairenensis</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>				

PCR-Analysis:

please notice the orientation of the tubes. They are marked on the strip at Tube 1 with an A and at Tube 8 with an H.

Tube	Sample	FAM	HEX	ROX
1	NTC	-	-	Inhibition Control
2	PTC	Positive Control	-	-
3	1	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
4	1	Wild yeast 1*	Bottom fermented yeast	Inhibition Control
5	1	Wild yeast 2*	Top fermented yeast	Acetic acid bacteria
6	2	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
7	2	Wild yeast 1*	Bottom fermented yeast	Inhibition Control
8	2	Wild yeast 2*	Top fermented yeast	Acetic acid bacteria

NTC: negative Control PTC: positive Control

Example for interpretation:

If sample 1 shows a positive FAM-signal in tube 4, wild yeast 1 is identified. If the sample contains mixtures, you have positive signals in different channels.

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.