



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Pectinatus / Megasphaera differentiation

- low –

Real-time PCR Nachweis und Differenzierung von
Pectinatus spp. und *Megasphaera spp.*

real-time PCR detection and differentiation of
Pectinatus spp. and *Megasphaera spp.*

REF: Q112

Version 01/20

GEN-IAL GmbH
Tel: 02241 2522980
Fax: 02241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

QuickGEN PCR Kit

Pectinatus / Megasphaera differentiation

1. Verwendungszweck

Nachweis und Differenzierung von *Pectinatus spp.* und *Megasphaera spp.* in Getränken durch die Real-time PCR (Polymerase Kettenreaktion) Methode.

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®) in weniger als zwei Stunden. Durch hot-start-PCR plus doppelt markierter sequenzspezifischer Sonden (FAM/DQ, HEX/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (ROX/DQ) wird gleichzeitig 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.

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
48 x Dye Strips (lyophilisiert, inkl. IC-DNA)	tube strips
1 x ddH ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH₂O 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 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 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 (ddH₂O)
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)
optional: Uracil N-Glycosylase (0,01 U/μL PCR-Reaktion)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung muss die 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.

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 Yeast Sample Preparation 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.

6.2 PCR-Programm:

Anmerkung:

Für die Verwendung von UNG muss das Programm entsprechend den Herstellerangaben geändert werden.

Schritt	Zeit	Temp.	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

Für MyGo Pro User:

Software 3.3.2

Schritt	Zeit	Temp.	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

Advanced Settings	Integration time (s)	0.5
	Acquisitions per Cycle	10

Software 3.4.8

Schritt	Zeit	Temp.	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	60 °C	

Advanced Settings Software 3.4:	Integration time (s)	0.5
--	----------------------	-----

7. Auswertung

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

***Pektinatus spp.*-DNA:** FAM-Kanal

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

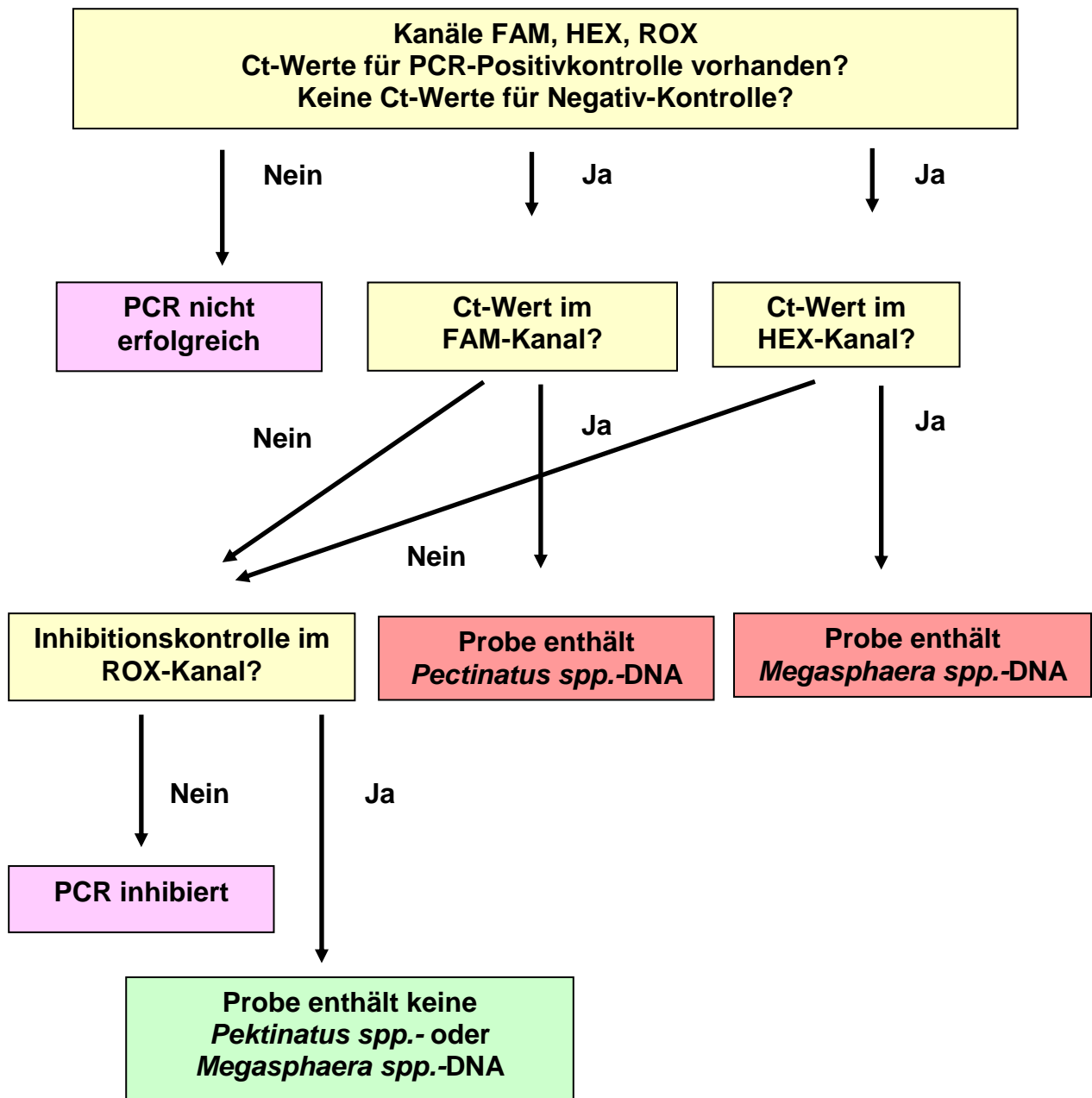
Inhibitionskontroll-DNA: ROX-Kanal

Eine Probe wird als ***Pektinatus spp.*** 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 Inhibitoren im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als ***Megasphaera 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 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

Pectinatus / Megasphaera differentiation

1. Intended use

Detection and differentiation of *Pectinatus spp.* and *Megasphaera spp.* in beverages by real-time PCR.

2. Test principle

The real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (TaqMan®), 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.

The kit contains specific systems for the detection of *Pectinatus spp.* and *Megasphaera spp.*. The system emits maximum fluorescent signals in the FAM/DQ and HEX/DQ channel. To avoid false negative PCR-results an Inhibition-Control is amplified together in the same reaction vessel with the specific sequence (ROX/DQ channel). The system contains dUTP. Optional: Use of Uracil-N-Glycosylase will eliminate any contamination with Uracil containing amplicons from former PCRs (the enzyme is not part of this kit).

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 PCR reactions:

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

4. Storage conditions

The Control-DNA is freeze-dried, it has to be solved in ddH₂O 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 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 tubes

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for 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)

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 ddH₂O to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

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

PCR-reaction per sample:

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

* if using the Simplex Easy DNA- or QuickGEN Yeast Sample Preparation 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.

6.2 PCR-Program

Note:

For the use of UNG the thermal cycler program has to be changed according to manufacturers' instructions.

Step	Time	Temp.	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

For MyGo Pro User:

Software 3.3.2

Step	Time	Temp.	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

Advanced Settings Software 3.3: Integration time (s) 0.5
 Acquisitions per Cycle 10

Software 3.4.8

Step	Time	Temp.	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	60 °C	

Advanced Settings Software 3.4: Integration time (s) 0.5

7. Evaluation

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

***Pectinatus spp.*-DNA:** FAM-channel

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

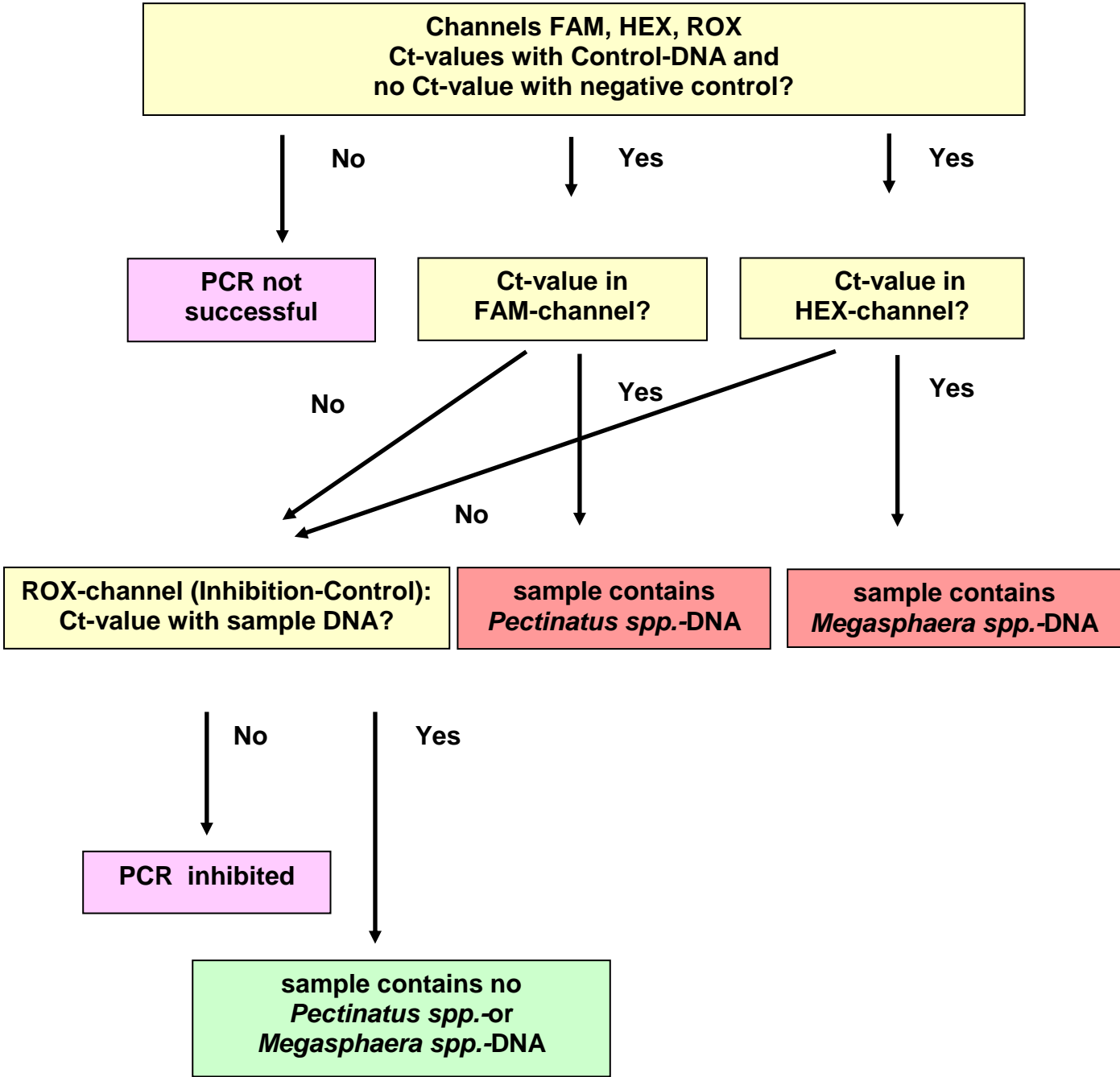
Inhibition Control-DNA: ROX-channel

A sample is ***Pectinatus spp.* 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 ***Megasphaera 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 in the sample (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 FAM-channel and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls have to show no amplification in the FAM-channel. The Inhibition Control in the HEX-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



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.