



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

Dekkera bruxellensis Standard DNA

200000 cfu

DNA Standard zur Quantifizierung von Dekkera bruxellensis

DNA standard for quantification of Dekkera bruxellensis

REF: Q360

Version 01/20

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

Dekkera bruxellensis Standard DNA

1. Verwendungszweck

Quantifizierung von *Dekkera bruxellensis* in Getränken (z.B. Wein und Most) durch die real-time PCR (Polymerase Kettenreaktion) Methode.

2. Testprinzip

Die Standard DNA enthält 200000 cfus / 2,5 µL PCR-Reaktion. Er wird zusammen mit dem Dekkera bruxellensis PCR-Kit (Q385, Q395) verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung von *Dekkera bruxellensis* in einer Probe wird die **Standard DNA** zur Erstellung einer Standardreihe verdünnt (z.B. 1:10). Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan[®]) in weniger als zwei Stunden. Durch *Hotstart*-PCR plus einer doppelt markierten sequenzspezifischen Sonde wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert.

3. Packungsinhalt

| | |
|--|---------------|
| 1 x Standard 200000 cfus/ 2,5 µL DNA (<i>D. bruxellensis</i> , lyophilisiert) | roter Deckel |
| 1 x Solution S (Aufnahme der lyophilisierten DNA und Herstellung v. Verd.) | grüner Deckel |

4. Lagerungsbedingungen

Die Standard DNA wird lyophilisiert geliefert und ist in dieser Form bei korrekter Lagerung mindestens 1 Jahr haltbar.

Vor Gebrauch in Solution S lösen (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilisierte **Standard DNA** bei 2 – 8 °C lagern.

Die rückgelöste Standard DNA ist bei 2 – 8 °C mindestens 2 Wochen stabil. Zur längeren Lagerung die Standard-DNAs bei -20 °C einfrieren.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

real-time PCR Gerät, mindestens mit FAM- und HEX-Kanal oder ROX-Kanal

Laborzentrifuge passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße

Pipetten für die PCR: 0,5 – 200 µL

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

sterile PCR-Reaktionsgefäße passend zum verwendeten Gerät

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

für das PCR-Kit: Colour Compensation

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vorbereitung

Vor der ersten Benutzung die Standard DNA kurz zentrifugieren und in Solution S lösen:

- die lyophilisierte Standard DNA in 100 µL Solution S aufnehmen
- 30 Minuten lösen lassen, dann gut mischen.

Herstellung einer Standardreihe z.B.:

Standard 2 wird aus Standard 1 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 1 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 2 20000 cfu / 2.5 µL.

Standard 3 wird aus Standard 2 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 2 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 3 2000 cfu / 2.5 µL.

Standard 4 wird aus Standard 3 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 3 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 4 200 cfu / 2.5 µL.

Empfehlung: Die Standards 1-4 zur längeren Lagerung bei -20 °C einfrieren.

PCR-Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe:

| Well | Standard | Volume (μL) | Premix (μL) |
|-------------|-----------------|--|--|
| 1 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 2 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 3 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 4 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 5 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 6 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 7 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |
| 8 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |

Bsp: PCR-Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe mit direkter Quantifizierung von Proben:

| Well | Standard | Volume (μL) | Premix (μL) |
|-------------|-----------------|--|--|
| 1 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 2 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 3 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 4 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 5 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 6 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 7 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |
| 8 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |
| 9 | Probe x | 2.5 | 17.5 |
| 10 | Probe y | 2.5 | 17.5 |
| 11 | PTC | 2.5 | 17.5 |
| 12 | NTC | ddH ₂ O | 17.5 |

Das PCR-Programm und die Auswertungsmodalitäten sind dem Handbuch des jeweiligen PCR-Kits zu entnehmen.

Dekkera bruxellensis Standard DNA

1. Intended use

Quantification of *Dekkera bruxellensis* in beverages (e.g. wine and grape must) by real-time PCR.

2. Test principle

The standard DNA contains 200000 cfus / 2.5 µL and is used as **Standard 1**. The **Standard 1** is prepared for using it in combination with a GEN-IAL Dekkera bruxellensis PCR-Kit (Q385, Q395). For quantification the Standard 1 has to be diluted (e.g. 1:10) three times to create a standard row for determination the *Dekkera bruxellensis* amount in a sample.

The real-time PCR is based on Hotstart-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.

3. Kit contents

Standard 1 contains sufficient DNA for 40 reactions.

| | |
|--|-----------|
| 1 x Standard 1 200000 cfus / 2.5 µL DNA (<i>D. bruxellensis</i> , freeze-dried) | red cap |
| 1 x Solution S (for solving the freeze-dried DNA and preparing dilutions) | green cap |

4. Storage conditions

The Standard DNA is freeze-dried, it has to be solved in Solution S prior to use (see 6.1).

The freeze-dried Standard should be stored at 2 – 8 °C (35 – 46 °F).

Once the freeze-dried DNA is dissolved, it is stable for at least 2 weeks at 2 °C – 8 °C (35 – 46 °F).

For longer storage it is recommended to freeze the standard DNAs at -20 °C (-4 °F).

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

real-time PCR instrument with at least FAM or SybrGreen™ and ROX or HEX

Standard bench top mini-centrifuge (1.5 – 2.0 mL vials)

Pipettes for 0.5 – 200 µL

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL

sterile optical tubes (plastic)

sterile filter tips

6. PCR

6.1. PCR-Setup

Preparations before first use:

*Before using the **Standard DNA** for the first time, the freeze-dried DNA has to be shortly centrifuged and carefully resolved:*

- add 100 µL sterile **Solution S** to the freeze-dried Standard DNA
- after 30 minutes mix well

Production of a standard row e.g.:

Standard 2 is produced from Standard 1 as follows: 5 µL Standard 1 + 45 µL Solution S. Thus Standard 2 has a concentration of 20000 cfu / 2.5 µL.

Standard 3 is produced from Standard 2 as follows: 5 µL Standard 2 + 45 µL Solution S. Thus Standard 3 has a concentration of 2000 cfu / 2.5 µL.

Standard 4 is produced from Standard 3 as follows: 5 µL Standard 3 + 45 µL Solution S. Thus Standard 4 has a concentration of 200 cfu / 2.5 µL.

Hint:

For longer storage it is recommended to freeze the standard DNAs at -20 °C (-4 °F).

Performing standard row:

| Well | Standard | Volume (µL) | Premix (µL) |
|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 2 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 3 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 4 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 5 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 6 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 7 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |
| 8 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |

Performing standard row including samples:

| Well | Standard | Volume (µL) | Premix (µL) |
|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | Standard 1 | 2.5 | 17.5 |
| 2 | Standard 2 | 2.5 | 17.5 |
| 3 | Standard 3 | 2.5 | 17.5 |
| 4 | Standard 4 | 2.5 | 17.5 |
| 5 | sample x | 2.5 | 17.5 |
| 6 | sample y | 2.5 | 17.5 |
| 7 | PTC | 2.5 | 17.5 |
| 8 | NTC | ddH ₂ O | 17.5 |

The PCR-Program and Analysis mode can be taken from the instruction manuals of the corresponding PCR-Kits.