



---

INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

# QuickGEN First-Beer PCR Kit

## P1 Taqman® Screening

Real-time PCR Kit zum Nachweis von  
bierschädlichen Bakterien und Hefen

real-time PCR kit for detection of  
beer spoilage bacteria and yeast

**Art. Nr. / Order No.: QPP1T 0050 / 0100 V 2.0**

Version 02/18

# QuickGEN First-Beer PCR Kit P1 Screening

Art. Nr.: QPP1T 0050 / 0100 **V 2.0**

(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* spp. *coryniformis*
- L. coryniformis* spp. *torquens*
- L. curvatus*
- L. delbrückii* spp. *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. paraplanitarum*
- L. rossiae*
- *Lactococcus* *lactis*
- *Megasphaera* spp.
- *Micrococcus* *kristiniae*
- *Pectinatus* spp.
- Pectinatus cerevisiiphilus*
- Pectinatus frisingensis*
- Pectinatus haikarae*
- Pectinatus* spp.
- *Pediococcus* spp.
- Pediococcus acidilactici*
- Pediococcus damnosus*
- Pediococcus dextrinicu*s
- Pediococcus inoptinatus*
- Pediococcus pentosaceus*
- Pediococcus parvulus*
- Pediococcus clausenii*

### Hefen

- *Saccharomyces* spp.
  - z.B. *S. diastaticus*, *S. bayanus*
  - S. pastorianus* *S. uvarum*
  - S. exiguis*, *S. ellipsoides*
  - S. fermentum*, *S. delbrückii*
  - S. kluyveri*, *S. cerevisiae*
  - *Brettanomyces* spp. (Dekkera)
    - z.B. *B. anomala*, *B. custersiana*
    - B. bruxellensis*
    - *Zygosaccharomyces*
      - z.B. *Z. bailii*, *Z. rouxii*
    - *Rhodotorula* spp.
  - *Torulaspora* spp.
  - *Kluyveromyces* spp.
    - z.B. *K. marxianus*, *K. polysporus*,
  - K. thermotolerans*
  - *Debaromyces* spp.
    - z.B. *D. hansenii*
    - *Candida* spp.
      - z.B. *C. albicans*, *C. parapsilosis*
      - *Hanseniaspora* spp.
        - z.B. *H. guillermondi*
        - *Pichia* spp.
          - z.B. *Pichia anomala*, *P. holstii*,  
*P. membranaefaciens*

## **2. Verwendungszweck**

Nachweis von bakteriellen und Hefe Kontaminationen in filtrierten Bier- und Biermischgetränken. Für stark hefehaltige Produkte sollte zum Nachweis bakterieller Kontaminationen das QPP1ToH Kit eingesetzt werden.

## **3. Testprinzip**

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; ROX/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (CY5/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 50 bzw. (100) Bestimmungen durchgeführt werden:

1 (2) x Premix QPP1T	weißer Deckel
1 (2) x QPP1T mix (lyophilisiert, inkl. IK-DNA)	dunkles Gefäß, roter Deckel
1 x ddH <sub>2</sub> O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

## **5. Lagerung**

**Der QPP1T mix und die Control-DNA werden lyophilisiert geliefert und müssen vor Gebrauch in ddH<sub>2</sub>O gelöst werden (siehe Punkt 7.1).**

Den lyophilisierten QPP1T 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 QPP1T 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 6 Monate haltbar.

## **6. Zusätzlich erforderliches Material**

### **6.1. Geräte:**

Real-time Gerät mit den Kanälen FAM, HEX (JOE), ROX und CY5

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

Zentrifuge für PCR-Platten oder Strips

Pipetten

„Vortex“

### **6.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien:**

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O)

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

PCR-Platten / Strips incl. Folien / Deckel

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 QPP1T Kits durchführen**

## 7. PCR

### 7.1. PCR-Ansatz

*Vor der ersten Benutzung müssen alle lyophilisierten Komponenten kurz zentrifugiert und in ddH<sub>2</sub>O gelöst werden:*

- den lyophilisierten QPP1T mix in 80 µL ddH<sub>2</sub>O aufnehmen
- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH<sub>2</sub>O aufnehmen
- 15 Minuten lösen

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

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix QPP1T	13,5
QPP1T mix	1,5
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	<b>20,0</b>

\* bei Verwendung des Simplex Easy DNA Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH<sub>2</sub>O hinzufügen

1. Den Mastermix aus Premix und QPP1T 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 µL Mastermix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäß efüllen.
4. 5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäß en geben, für die PCR-Positivkontrolle 5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 5 µL und für die PCR-Negativkontrolle\* 5 µL steriles ddH<sub>2</sub>O pipettieren (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln).
5. Die PCR-Reaktionsgefäß e sofort verschließen und kurz zentrifugieren.
6. Die PCR-Gefäß e ins PCR-Gerät stellen und den Lauf starten.

**Sehr wichtig: \* Die PCR-Negativkontrolle bitte auf jeden Fall mit 5 µL ddH<sub>2</sub>O 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. QPP1T
4. Im Fenster **Filter Combination Selection** die folgenden Filterkombinationen ankreuzen: 440-488 / 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 factor	Max. Integ. Time
440	488	440-488 Cyan	1	10	2
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)
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 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

## 7.2.2 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. Für die Verwendung von UNG müssen die Programme entsprechend der Herstellerangaben geändert werden.

Step	Time	Temp.	
Lytikasebehandlung	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 35 x
Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

## 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 in der fit point Analyse über die Hintergrundfluoreszenz gehoben werden.

Für LC480: Vor der Auswertung Colour Compensation aktivieren

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

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

**Hefe-DNA:** HEX- oder JOE-Kanal (LC480: 533-580 nm)

**Inhibitionskontroll-DNA:** CY5-Kanal (LC480: 618-660 nm)

Eine Probe wird als **Lactobacillen/Pediococcen** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal (465-510 nm)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-Kanal (618-660 nm) kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

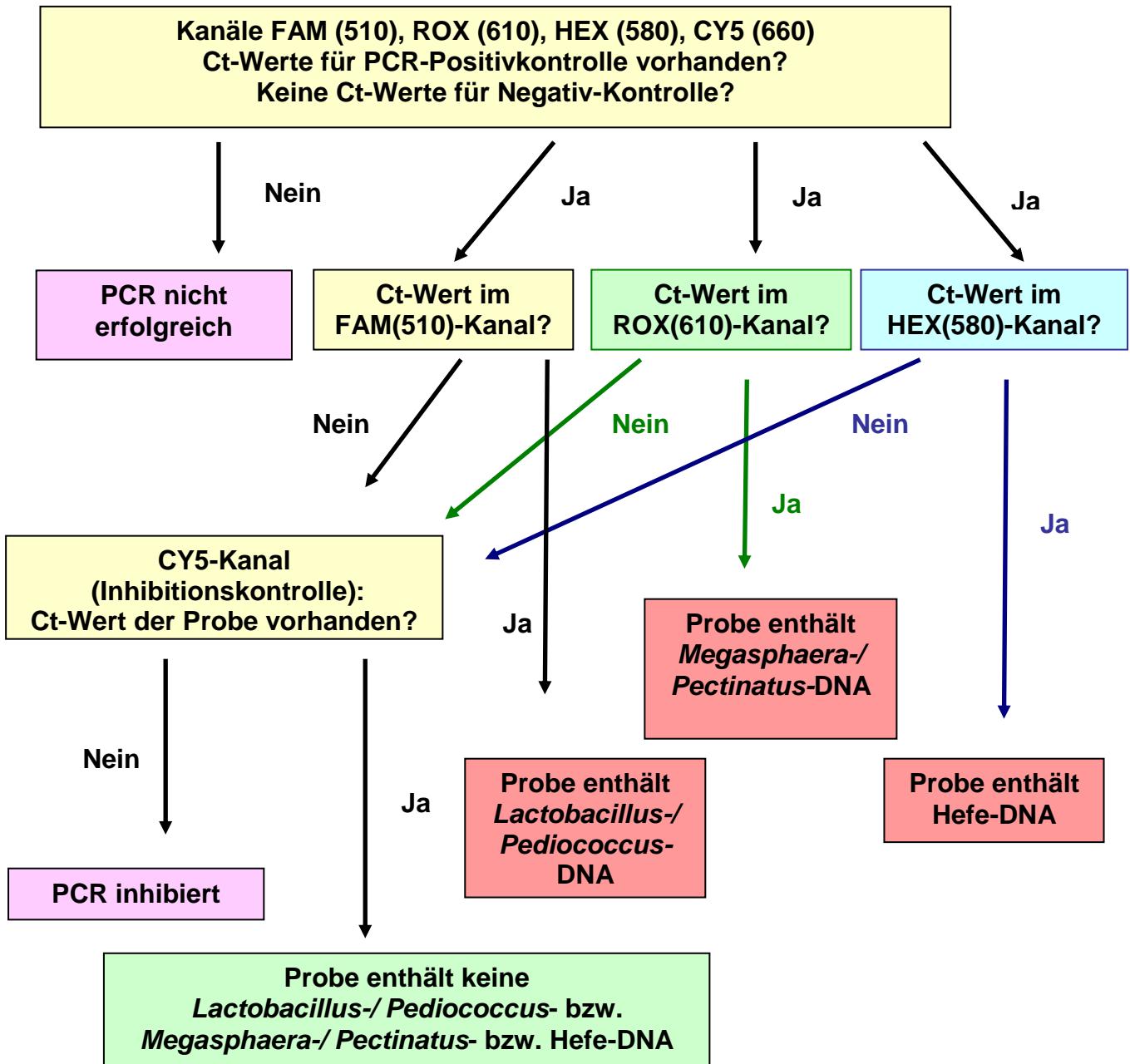
Eine Probe wird als **Megasphaera/Pectinatus** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ROX-Kanal (533-610 nm)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-Kanal (618-660 nm) kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als **Hefe** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **HEX oder JOE-Kanal (533-580 nm)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-Kanal (618-660 nm) 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

## 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 lizenpflichtig. 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 Screening

Order No.: QPP1T 0050 / 0100 V 2.0

(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* / *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. paraplanтарum*  
*L. rossiae*  
➤ *Lactococcus* *lactis*  
➤ *Megasphaera* spp.  
➤ *Micrococcus* *kristiniae*  
➤ *Pectinatus* spp.  
*Pectinatus cerevisiiphilus*  
*Pectinatus frisingensis*  
*Pectinatus haikarae*  
*Pectinatus* ssp.  
➤ *Pediococcus* spp.  
*Pediococcus acidilactici*  
*Pediococcus damnosus*  
*Pediococcus dextrinicu*s  
*Pediococcus inoptinatus*  
*Pediococcus pentosaceus*  
*Pediococcus parvulus*  
*Pediococcus claussenii*

### Yeast

- *Saccharomyces* spp.  
z.B. *S. diastaticus*, *S. bayanus*  
  
*S. pastorianus* *S. uvarum*  
*S. exiguis*, *S. ellipsoides*  
  
*S. fermentum*, *S. delbrückii*  
*S. kluyveri*, *S. cerevisiae*  
➤ *Brettanomyces* spp. (*Dekkera*)  
z.B. *B. anomala*, *B. custersiana*  
*B. bruxellensis*  
➤ *Zygosaccharomyces*  
z.B. *Z. bailii*, *Z. rouxii*  
➤ *Rhodotorula* spp.  
  
➤ *Torulaspora* spp.  
  
➤ *Kluyveromyces* spp.  
z.B. *K. marxianus*, *K. polysporus*,  
  
*K. thermotolerans*  
➤ *Debaromyces* spp.  
z.B. *D. hansenii*  
➤ *Candida* spp.  
z.B. *C. albicans*, *C. parapsilosis*  
➤ *Hanseniaspora* spp.  
z.B. *H. guillermondii*  
➤ *Pichia* spp.  
z.B. *Pichia anomala*, *P. holstii*  
*P. membranaefaciens*

## **2. Intended use**

Qualitative detection of bacterial and yeast contaminations in filtrated beer and beer mixes. For products with high amount of yeast use the QPP1ToH kit for detection of bacterial contaminants.

## **3. 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 (CY5/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 50 or (100) PCR reactions:

1 (2) x Premix QPP1T	white cap
1 (2) x QPP1T mix (freeze-dried, incl. IC-DNA)	dark vial, red cap
1 x ddH <sub>2</sub> O	colourless cap
1 x Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

## **5. Storage conditions**

**The QPP1T mix and the Control-DNA are freeze-dried, they have to be solved in ddH<sub>2</sub>O prior to use (see 7.1).**

Do not freeze the lyophilized QPP1T 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 QPP1T 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 with channels FAM, HEX (JOE), ROX and CY5

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for multiwell plates or stripes

Pipettes

“Vortex”

### **6.2. Reagents and plastic ware:**

sterile ddH<sub>2</sub>O

sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL

sterile plates or optical tubes (plastic)

sterile filter tips

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

Colour Compensation Set for LC480 (GEN-IAL<sup>®</sup>, PP1T CC LC480 0005)

**LC480: Use a Colour compensation prior to first use of QPP1T Kit!**

## 7. PCR

### 7.1. 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<sub>2</sub>O to freeze-dried QPP1T mix
- add 55 µL sterile ddH<sub>2</sub>O 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	volume (µL)
Premix QPP1T	13.5
QPP1T mix	1.5
Sample-DNA	5.0*
Total volume	<b>20.0</b>

\* if using the Simplex easy DNA kit: add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH<sub>2</sub>O

1. Prepare a mastermix by mixing Premix and QPP1T 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 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<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O 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: QPP1T
4. Open the window **Filter Combination Selection** and choose the following filter combinations: 440-448 / 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 fact	Max. Integ. Time
440	488	440-488 Cyan	1	10	2
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 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)
37	None	00:15:00	4.40		0	0	0
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**

### **7.2.2 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“.

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

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 35 x
Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

## **8. Evaluation**

The evaluation has to be made according to the data analysis programme 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.

For LC480: Activate Colour Compensation

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

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

***Yeast-DNA:*** HEX- or JOE-channel (LC480: 533-580 nm)

***Inhibition Control-DNA:*** CY5-channel (LC480: 618-660 nm)

A sample is ***Lactobacillus/Pediococcus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel (465-510 nm)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-channel (618-660 nm) 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.

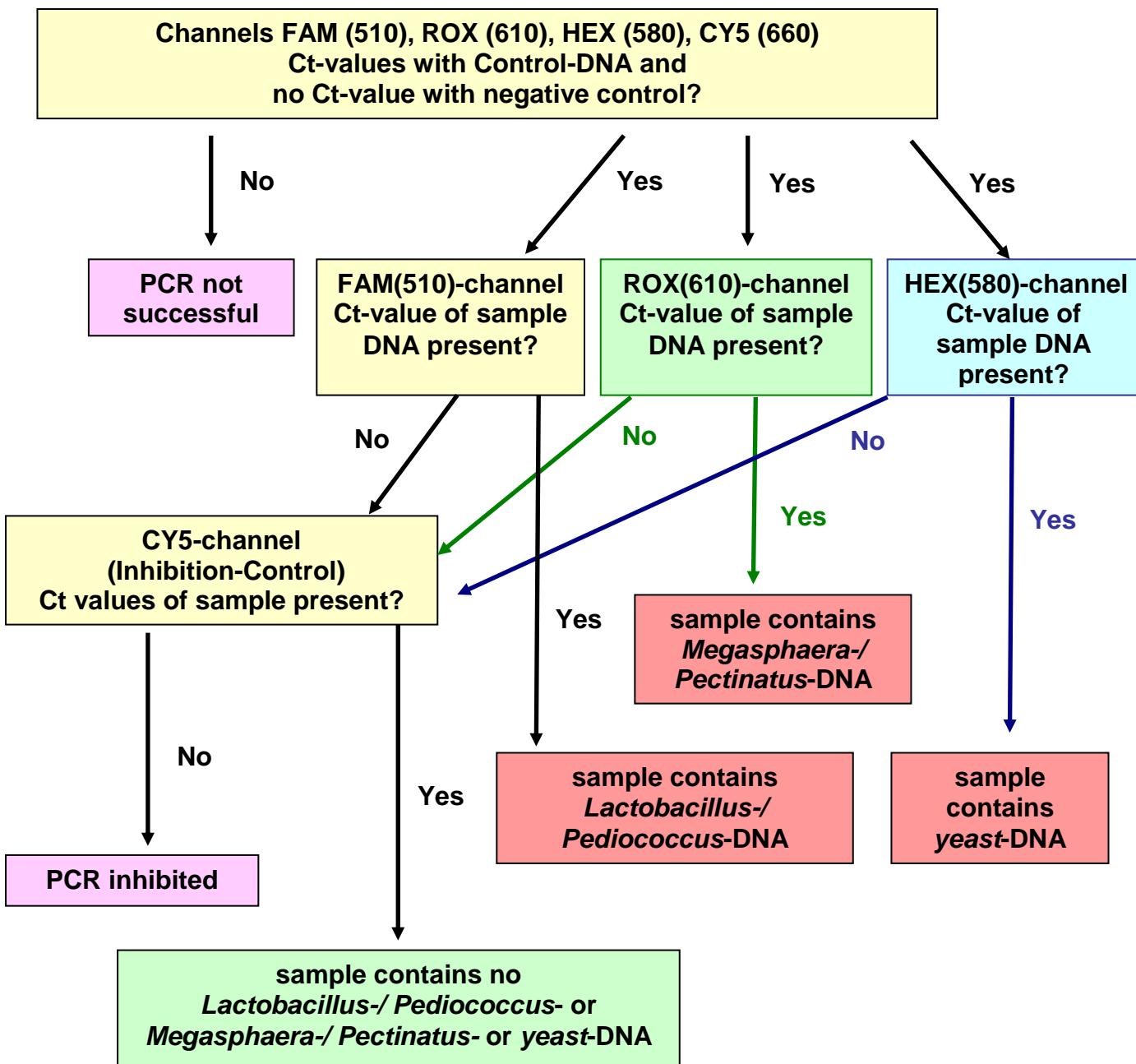
A sample is ***Megasphaera/Pectinatus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **ROX-channel (533-610 nm)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-channel (618-660 nm) 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 ***yeast*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **HEX-/JOE-channel (533-580 nm)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-channel (618-660 nm) 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 CY5-channel (618-660 nm) 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.