



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN First-Yeast PCR Kit

Saccharomyces diastaticus

Real-time PCR Kit zum Nachweis von
Saccharomyces diastaticus

real-time PCR Kit for detection of
Saccharomyces diastaticus

Art.Nr. / Order No.: QTPYSD 0048 high

Version 02/18

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

QuickGEN First-Yeast PCR Kit *Saccharomyces diastaticus*

Art. Nr.: QTPYSD 0048 high

(Version 02/18)

1. Verwendungszweck

Nachweis von *Saccharomyces diastaticus* in Getränken (z.B. Wein und Most).

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierter sequenzspezifischer Sonden (FAM/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (HEX/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. **In den tubes ist die Lytikase bereits enthalten.**

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

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

4. Lagerung

Die lyophilisierte Control-DNA muss vor Gebrauch in ddH₂O gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Den lyophilisierten QTPYSD 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 QTPYSD mix enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollte er keinem unnötigen Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 6 Monate haltbar.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für high 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 lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und in ddH₂O gelöst werden:

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

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 QTPYSD	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

6.2 PCR-Programm

Anmerkung:

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

Step	Time	Temp.	
Lytikasebehandlung	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	63 °C	

7. 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.

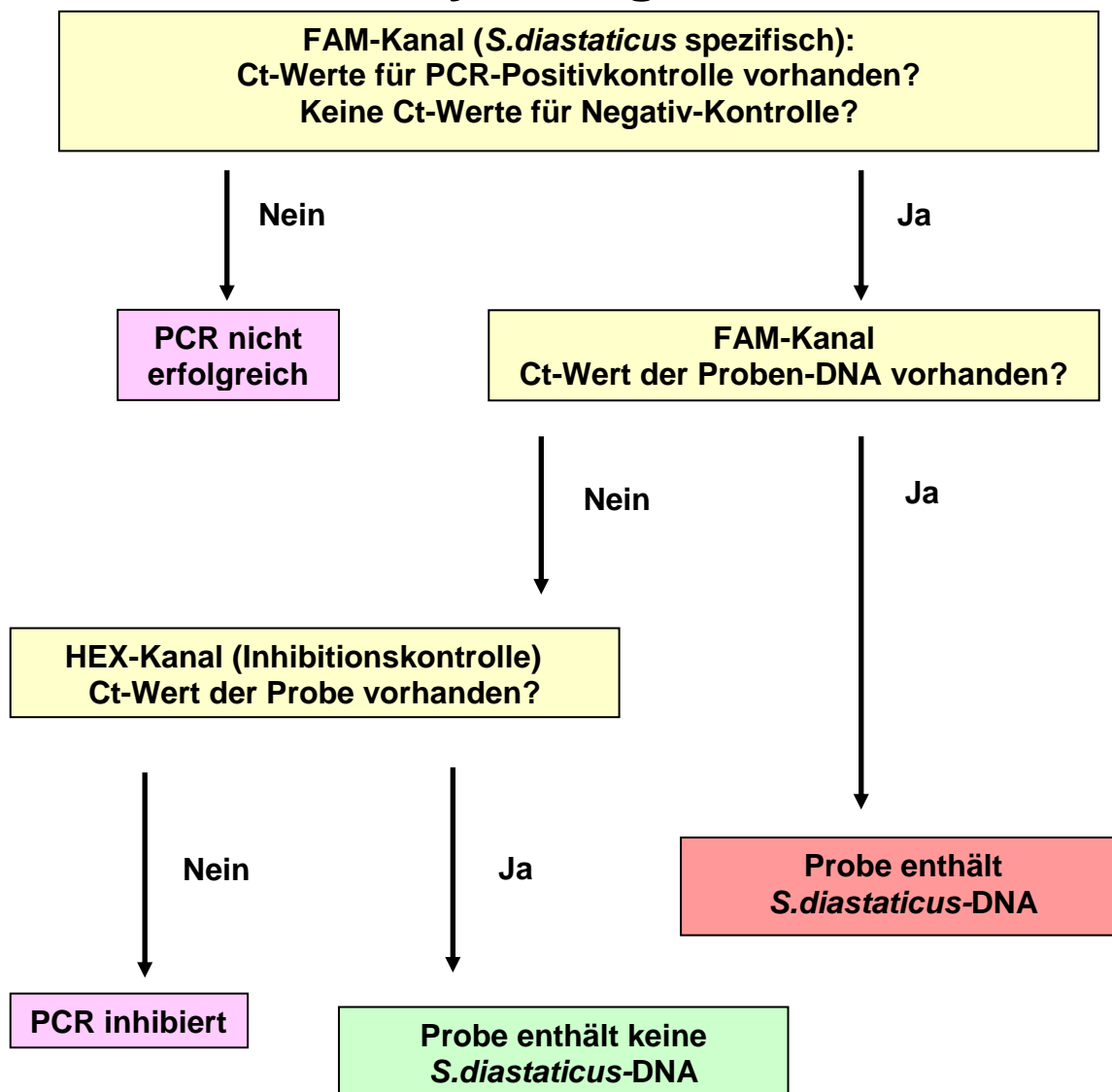
Saccharomyces diastaticus-DNA: FAM-Kanal

Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal

Eine Probe wird als **Saccharomyces diastaticus** 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 HEX-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 negativ bewertet, wenn der Ansatz der Probe im FAM-Kanal negativ ist und die PCR-Positivkontrolle gleichzeitig positiv ist. Die PCR-Negativkontrolle muss im FAM-Kanal negativ sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal muss im Probenansatz und in den Negativkontrollen positiv sein, um ein falsch negatives Ergebnis durch inhibitorische Effekte auszuschließen.

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-Yeast PCR Kit *Saccharomyces diastaticus*

Order No.: QTPYSD 0048 high

(Version 02/18)

1. Intended use

Detection of *Saccharomyces diastaticus* in wine and grape must 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 a specific system for the detection of *S.diastaticus*. The system emits a maximum fluorescent signal in the FAM/DQ channel. To avoid false negative PCR-results an Inhibition-Control is amplified together in the same reaction vessel with the specific sequence (HEX/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). **The tubes contain Lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 reactions.

1 x Premix QTPYSD	white cap
48 x QTPYSD mix (freeze-dried, incl. Lyticase and IC-DNA)	tube strips
6 x cap 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 and has to be solved in ddH₂O prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized QTPYSD 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 QTPYSD mix contains the fluorescent labelled probes and should be handled light protected.

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

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

Real-time PCR machine for high profile tubes

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL vials

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 mix)

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.

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 per sample:

PCR-components	amount (μL)
Premix QTPYSD	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 PCR positive control, 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 programmes have to be changed according to manufacturer's instructions.

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	63 °C	

7. 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.

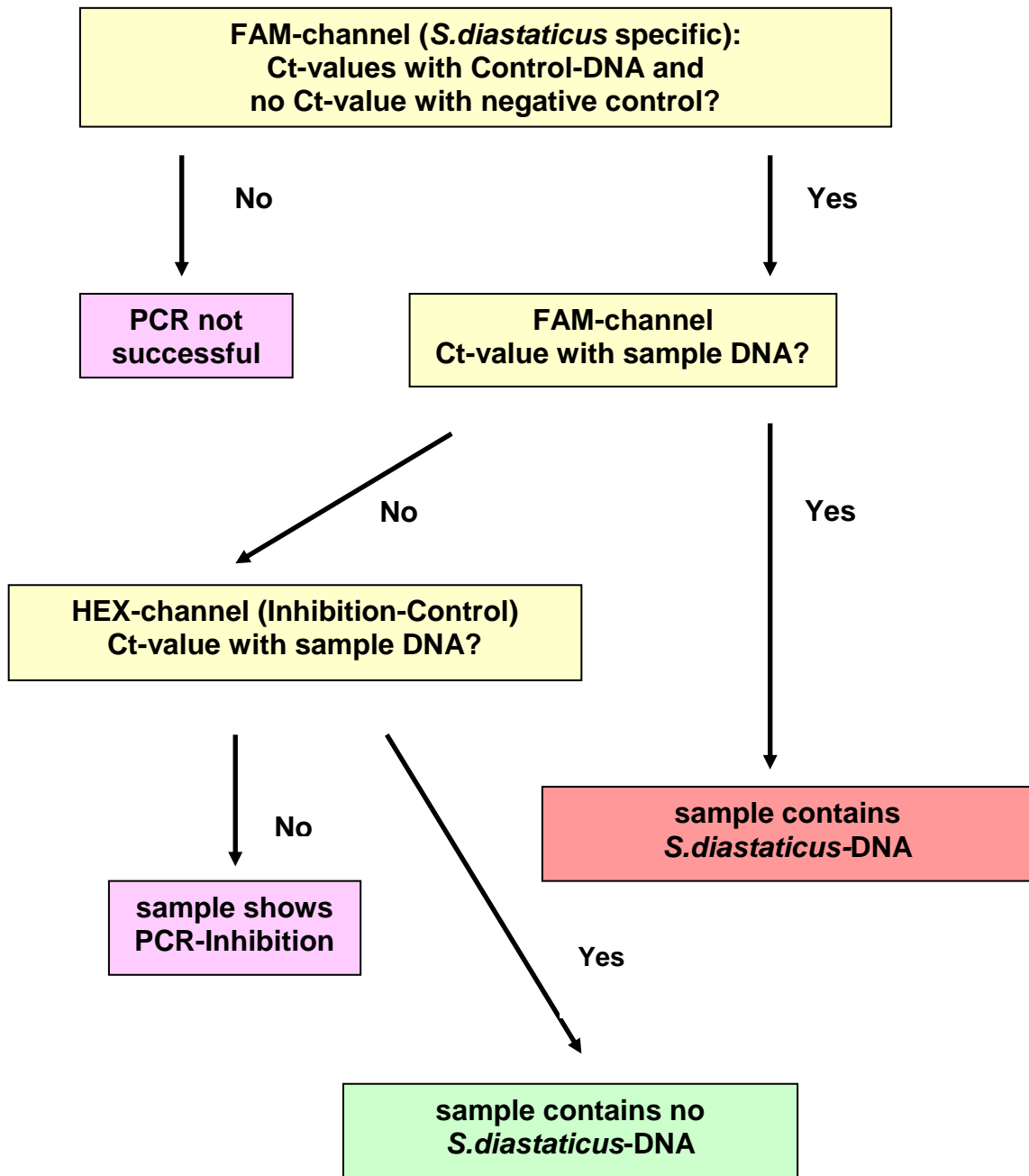
***S.diastaticus*-DNA:** FAM-channel

Inhibition Control-DNA: HEX-channel

A sample is ***S.diastaticus* 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 HEX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). For 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.