INSTITUT FÜR **A**NGEWANDTE **L**ABORANALYSEN GMBH

QuickGEN First-Yeast PCR Kit
Wild yeast

Real-time PCR Kit zur Differenzierung
von Fremdhefen

real-time PCR kit for differentiaton of
wild yeast

Art. Nr. / Order No.: QTPWY 0096 low

Version 02/18

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

QuickGEN First-Yeast PCR Kit
Wild yeast

Art. Nr.: QTPWY 0096 low

(Version 02/18)

1. Verwendungszweck

Differenzierung von Fremdhefen in Bier und Biermischgetränken.
Folgende Hefen werden detektiert:

Candida glabrata	*Candida albicans*	*Candida kefyr*	*Candida intermedia*	*Candida parapsilosis*
Candida sake	*Candida tropicalis*	*Debaromyces hansenii*	*Dekkera anomala*	*Dekkera bruxellensis*
Dekkera custersiana	*Dekkera naardenensis*	*Hanseniaspora guillermondii*	*Hanseniaspora uvarum*	*Hanseniaspora osmophila*
Kluyveromyces marxianus	*Metschnikowia pulcherrina*	*Pichia anomala*	*Pichia membranaefaciens*	*Pichia fermentans*
Pichia guilliermondii	*Issotchenkia orientalis*	*Kazachstania exigua*	*Naumovozyma dairenensis*	*Saccharomyces diastaticus*
Saccharomycodes ludwigii	*Torulaspora delbrückii*	*Zygosaccharomyces rouxii*	*Zygosaccharomyces bailii*	

2. Testprinzip

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

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 96 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix QTPWY	weißer Deckel
12 x QTPWY mix (lyophilisiert, tubes enthalten Lytikase)	tube strips
1 x ddH_2O (für PCR-Negativkontrollen)	farbloser Deckel

4. Lagerung

Der QTPWY mix wird in den strips lyophilisiert geliefert und ist in dieser Form bei korrekter Lagerung (4 - 8 °C) mindestens 6 Monate haltbar.

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.

Die tube strips enthalten den QTPWY mix mit fluoreszenzmarkierten Sonden und sind lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollten sie nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für low profile PCR tubes clear
Zentrifuge für tube strips
Pipetten
„Vortex“

5.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH_2O)
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)
optional: Uracil N-Glycosylase (0,01 U/µL PCR-Reaktion)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Premix vor Gebrauch gut mischen und ggf. kurz abzentrifugieren.

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	**Menge (µL)**
Premix QTPWY	17,5
Proben-DNA	2,5
Gesamtvolumen	**20,0**

Pipettierschema:

Tube 1*	Premix 17,5 µL	**ddH_2O 2,5 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Negativkontrolle)**
Tube 2*	Premix 17,5 µL	**ddH_2O 2,5 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Positivkontrolle)**
Tube 3*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **1** 2,5 µL
Tube 4*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **1** 2,5 µL
Tube 5*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **2** 2,5 µL
Tube 6*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **2** 2,5 µL
Tube 7*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **3** 2,5 µL
Tube 8*	Premix 17,5 µL	DNA der Probe **3** 2,5 µL

*** auf die Orientierung der Tubes achten: Die Deckel sind nach rechts zu öffnen**

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 of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	

Für MyGo Pro User **Advanced Settings:** Integration time (s) 0.5
Acquisitions per Cycle 10

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 über die Hintergrundfluoreszenz gehoben werden.

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

Die in der Tabelle angegebene Inhibitionskontrolle der Probe muss im HEX-Kanal positiv sein. Ist die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal negativ, deutet dies auf inhibitorische Komponenten oder einer zu hohen DNA-Menge im Reaktionsansatz hin.

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.

PCR-Auswertung:

auf die Orientierung der Tubes achten: Die Deckel sind nach rechts zu öffnen

	Kanäle	Spezies	Signal
Tube 1 (NTC)	FAM HEX	Negativkontrolle (NTC) Inhibitionskontrolle	negativ positiv
Tube 2 (PTC)	FAM HEX	Positivkontrolle (PTC) Inhibitionskontrolle	positiv
Tube 3 (Probe 1)	FAM HEX	Fremdhefe 1 Inhibitionskontrolle	
Tube 4 (Probe 1)	FAM HEX	Fremdhefe 2 Inhibitionskontrolle	
Tube (Probe 2)	FAM HEX	Fremdhefe 1 Inhibitionskontrolle	
Tube 6 (Probe 2)	FAM HEX	Fremdhefe 2 Inhibitionskontrolle	
Tube 7 (Probe 3)	FAM HEX	Fremdhefe 1 Inhibitionskontrolle	
Tube 8 (Probe 3)	FAM HEX	Fremdhefe 2 Inhibitionskontrolle	

Beispiel zur Auswertung:

Probe zeigt positives FAM-Signal in Tube 3: Probe 1 ist positiv für Fremdhefen der Gruppe 1

Fremdhefe 1 detektiert:

Dekkera anomala	*Dekkera bruxellensis*	*Dekkera custersiana*	*Dekkera naardenensis*	*Debaromyces hansenii*
Hanseniaspora guillermondii	*Hanseniaspora osmophila*	*Hanseniaspora uvarum*	*Issotchenkia orientalis*	*Kazachstania exigua*
Kluyveromyces marxianus	*Metschnikowia pulcherrina*	*Pichia anomala*	*Pichia fermentans*	*Pichia membranaefaciens*
Saccharomyces diastaticus	*Saccharomycodes ludwigii*	*Torulaspora delbrückii*		

Fremdhefe 2 detektiert:

Candida glabrata	*Candida albicans*	*Candida kefyr*	*Candida intermedia*	*Candida parapsilosis*
Candida sake	*Candida tropicalis*	*Naumovozyma dairenensis*	*Pichia guilliermondii*	*Zygosaccharomyces bailii*
Zygosaccharomyces rouxii				

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.

Wild yeast

Order No.: QTPWY 0096 low

(Version 02/18)

1. Intended use

Differentiation of wild yeast in beer and beer mixing drinks.
The following yeast are differentiated:

Candida glabrata	*Candida albicans*	*Candida kefyr*	*Candida intermedia*	*Candida parapsilosis*
Candida sake	*Candida tropicalis*	*Debaromyces hansenii*	*Dekkera anomala*	*Dekkera bruxellensis*
Dekkera custersiana	*Dekkera naardenensis*	*Hanseniaspora guillermondii*	*Hanseniaspora uvarum*	*Hanseniaspora osmophila*
Kluyveromyces marxianus	*Metschnikowia pulcherrina*	*Pichia anomala*	*Pichia membranaefaciens*	*Pichia fermentans*
Pichia guilliermondii	*Issotchenkia orientalis*	*Kazachstania exigua*	*Naumovozyma dairenensis*	*Saccharomyces diastaticus*
Saccharomycodes ludwigii	*Torulaspora delbrückii*	*Zygosaccharomyces rouxii*	*Zygosaccharomyces bailii*	

2. Test principle

The TaqMan® real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; HEX/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). **The tubes contain lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 96 PCR reactions (12 samples):

1 x Premix QTPWY	white cap
12 x QTPWY mix (freeze-dried, tubes contain lyticase)	tube strips
1 x ddH_2O (for PCR negative controls)	colourless cap

4. Storage conditions

The QTPWY mix is freeze-dried in the strips and should be stored at 4 – 8 ° C (39 – 46 °F).

Keep Premix 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 tube strips with the QTPWY mix contain 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 low profile tubes clear
Centrifuge for tube strips
Pipettes
“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH_20
sterile filter tips
optional: Uracil N-Glycosylase (0.01 U/µL added to the PCR reaction mix)

6. PCR

6.1. PCR-Setup

Before every use thoroughly mix Premix and centrifuge briefly.

PCR-reaction setup:

PCR-Components	**Volume (µL)**
Premix QTPWY	17.5
Sample-DNA	2.5
Total volume	**20.0**

Pipetting schema**:**

Tube 1*	Premix 17.5 µL	**ddH_2O 2.5 µL, Attention: pipette no sample-DNA (negative control)**
Tube 2*	Premix 17.5 µL	**ddH_2O 2,5 µL, Attention: pipette no sample-DNA (positive control)**
Tube 3*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **1** 2.5 µL
Tube 4*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **1** 2.5 µL
Tube 5*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **2** 2.5 µL
Tube 6*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **2** 2.5 µL
Tube 7*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **3** 2.5 µL
Tube 8*	Premix 17.5 µL	DNA of sample **3** 2.5 µL

*** please notice the orientation of the tubes: they have to be opened to the right side**

6.2 PCR-Program

Note:
For the use of UNG the thermal cycler programm has to be changed according to manufacturers` instructions.

Step	**Time**	**Temp.**	
Lyticasetreatment	15 min	37 °C	
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 **Advanced Settings:** Integration time (s) 0.5
Acquisitions per Cycle 10

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.

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

The Inhibition Control of the sample has to be positive in the HEX-channel. Is the Inhibition Control in the HEX-channel negative inhibitors or high amount of DNA are in the sample reaction.

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

PCR-Analysis:

please notice the orientation of the tubes: they have to be opened to the right side

	Channels	Species	Signal
Tube 1 (NTC)	FAM HEX	Negative control (NTC) Inhibition-Control	negative positive
Tube 2 (PTC)	FAM HEX	Positive control (PTC) Inhibition-Control	positive
Tube 3 (Sample 1)	FAM HEX	Wild yeast 1 Inhibition-Control	
Tube 4 (Sample 1)	FAM HEX	Wild yeast 2 Inhibition control	
Tube 5 (Sample 2)	FAM HEX	Wild yeast 1 Inhibition control	
Tube 6 (Sample 2)	FAM HEX	Wild yeast 2 Inhibition control	
Tube 7 (Sample 3)	FAM HEX	Wild yeast 1 Inhibition control	positive
Tube 8 (Sample 3)	FAM HEX	Wild yeast 2 Inhibition control	positive

Example for interpretation:

Sample shows a positive FAM-signal in Tube 3: sample 1 is positive for wild yeast group 1

Wild yeast 1 detects:

Dekkera anomala	*Dekkera bruxellensis*	*Dekkera custersiana*	*Dekkera naardenensis*	*Debaromyces hansenii*
Hanseniaspora guillermondii	*Hanseniaspora osmophila*	*Hanseniaspora uvarum*	*Issotchenkia orientalis*	*Kazachstania exigua*
Kluyveromyces marxianus	*Metschnikowia pulcherrina*	*Pichia anomala*	*Pichia fermentans*	*Pichia membranaefaciens*
Saccharomyces diastaticus	*Saccharomycodes ludwigii*	*Torulaspora delbrückii*		

Wild yeast 2 detects:

Candida glabrata	*Candida albicans*	*Candida kefyr*	*Candida intermedia*	*Candida parapsilosis*
Candida sake	*Candida tropicalis*	*Naumovozyma dairenensis*	*Pichia guilliermondii*	*Zygosaccharomyces bailii*
Zygosaccharomyces rouxii				

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.