TM DETECTION KIT B LACTOBACILLUS PARABUCHNERI

Zur Identifizierung von Lactobacillus parabuchneri

Art.-Nr. 2001-26

PIKA WEIHENSTEPHAN
PRODUKTE FÜR INNOVATIVE KONTROLLE UND ANALYTIK

Achtung! Lesen Sie die Gebrauchsanweisung und die Sicherheitsdatenblätter vor Beginn der Analyse aufmerksam durch. Die Sicherheitsdatenblätter sind im Downloadbereich auf www.pika-weihenstephan.de zu finden. Alle Probenbearbeitungsschritte sollten möglichst unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Tragen Sie während der Ausführung der Analyse adäquate Schutzbekleidung und puderfreie Einweghandschuhe. Die Verwendung von Filter-Pipettenspitzen wird empfohlen. Nur zu Forschungszwecken zu verwenden!

Produktbeschreibung

Der PCR Kit Lactobacillus parabuchneri wurde zur Identifizierung von Lactobacillus parabuchneri entwickelt.

PCR Kit Inhalt

Mitgelieferte Materialien, ausreichend für 48 Reaktionen

Bezeichnung	Volumen	Lagerung*
Reagenzien für DNA Isolierung		
Waschpuffer A (gelber Deckel)	1 x 10,0 ml	4°C
Lysepuffer B (blauer Deckel)	2 x 10,0 ml	
Reagenzien und Materialien für DNA Analyse		
Rehydratisierungspuffer B (weißer Deckel)	1 x 5,0 ml	4°C
DNA (roter Deckel) als Positivkontrolle	1 x 50 µl	
PCR-Gefäße (8er-Streifen) mit Oligo Mix	6	
Deckelstreifen (8er-Streifen) zum Verschließen der PCR-Gefäße	6	4°C oder Raumtemperatur

* Kit wird bei Raumtemperatur versendet

Benötigte Materialien, die nicht mitgeliefert werden

Material
Instrumente und Equipment
Real-time PCR System im Mikrotiter Format (0,2 ml Gefäße) mit Mess-Kanälen für FAM (520 nm Emission) und VIC/HEX (550 nm Emission)
Tischzentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße
Plattenzentrifuge oder Adapter für 8er Streifen
Reagenzglasschüttler (Vortexer)
Thermoheizblock oder Wasserbad beheizbar bis mind. 80°C
Pipetten
Verbrauchsmaterialien und Reagenzien
Puderfreie Einweghandschuhe
1,5 ml Reaktionsgefäße, safe-lock, steril
Filterspitzen
2-fach konzentrierter Master Mix mit DNA Polymerase + dNTPs + $MgCl_2$

Durchführung der Analyse

Teil 1: Probenverarbeitung

1. Die Probe wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:
   a) *Flüssige Proben:*
   - 50 µl von einer bakteriell getrübten Probe
   - 1,0 – 1,5 ml von einer nicht trüben Probe (ggf. kann auch größeres Volumen zur Zentrifugation eingesetzt werden)
   - 50 – 200 µl von Anstellhefe, um nach der Zentrifugation ein Pellet von maximal 2 mm zu erhalten (vgl. Abb. 1)

   b) *Kolonien:* Sowohl einzelne Kolonien als auch mehrere Kolonien gemeinsam können als eine Probe bearbeitet werden
   - 200 µl Waschpuffer A in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren und die Kolonie(n) in die Flüssigkeit geben. Schritte 4. bis 6. werden dann weggelassen.
2. Probe in einer Mikroliterzentrifuge bei 12.000 bis 14.000 U/min (25.000 x g) 3 min zentrifugieren; alternativ für Zentrifugen mit niedriger Drehzahl: 10 min bei 4.000 U/min (1.500 x g)
3. Die Größe des Pellets kontrollieren, es enthält die Bakterienzellen aus der Probe. Das Pellet darf eine Größe von ca. 2 mm Durchmesser nicht überschreiten (siehe Abb. 1). Falls nötig, einen Teil vom Pellet mit dem Überstand verwerfen
4. Überstand vorsichtig abpipettieren oder abgießen und verwerfen
5. Optional: 200 µl Waschpuffer A zum Pellet zugeben, Pellet gut resuspendieren und die Schritte 2-3 wiederholen
6. 200 µl Lysepuffer B zum Pellet zugeben
7. 10 min bei 80 °C ± 5 °C (Thermomixer oder Wasserbad) inkubieren
8. Nochmals wie unter 2. zentrifugieren
   Das Pellet enthält Reste der Zellwände und andere von der DNA abgetrennte Partikel.
9. 100 µl des Überstandes, der die DNA enthält, in ein frisches Reaktionsgefäß umpipettieren und für die PCR Analyse benutzen, ggf. für die Lagerung bei –18 bis –20 °C einfrieren

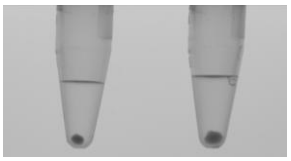


Abb.1: empfohlene Pelletgrößen
Links: max. bakterielle Pelletgröße
Rechts: max. Pelletgröße für Probe, die Hefe enthält

Teil 2: DNA-Analyse

Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme von 2-fach konz. Master Mix werden bereits in den PCR-Gefäßen vordosiert und getrocknet geliefert. Alle PCR-Gefäße enthalten Oligo Mix sowie eine *interne Positivkontrolle (IPC).*

Pro Probe wird ein PCR-Gefäß Oligo Mix benötigt. Zusätzlich werden pro Lauf je ein Gefäß für Positiv- und Negativkontrolle benötigt.

Zur Aktivierung der Reaktionskomponenten wird ein Aliquot Rehydratisierungsmix, bestehend aus Rehydratisierungspuffer B und 2-fach konz. Master Mix (nicht im Produkt enthalten), pro PCR-Gefäß zugegeben. Für alle zu analysierenden Proben wird ein gemeinsamer Rehydratisierungsmix hergestellt wie in Tabelle 1 angegeben.

Herstellung und Verteilung des PCR-Rehydratisierungsmixes

Pro Probe wird ein PCR-Gefäß benötigt. Wir empfehlen eine Positiv- und eine Negativkontrolle pro PCR mitlaufen zu lassen.

1. Die benötigte Menge an Reagenzien berechnen, welche für den Rehydratisierungsmix benötigt wird (Tabelle 1)
2. Alle Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein steriles Reaktionsgefäß pipettieren
3. Reaktionsgefäß schließen, schütteln und zum Sammeln kurz anzentrifugieren

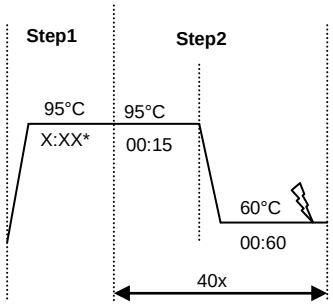
Komponenten	Pro PCR-Reaktion	+ 10% als Pipettierreserve	multipliziert mit Probenzahl n zzgl. 2 Kontrollen	***gesamtes Volumen* für *Rehydratisierungsmix***
Rehydratisierungspuffer B	10,0 µl	1,0 µl	(n + 2)	**= 11,0 µl x (n+2)**
2-fach konz. Master Mix	15,0 µl	1,5 µl	(n + 2)	**= 16,5 µl x (n+2)**
Gesamtvolumen Rehydratisierungsmix	25,00 µl	2,5 µl	(n + 2)	**= 27,5 µl x (n+2)**

Tabelle 1: Herstellung des Rehydratisierungsmixes

Verarbeitung der Proben für die PCR

1. 25 µl des Rehydratisierungsmixes werden pro PCR-Gefäß pipettiert
2. 5,0 µl der extrahierten Probe (aus Teil 1 Probenverarbeitung) in ein PCR-Gefäß aus 1. pipettieren
3. Für die Kontrollen:
   - 5,0 µl von der mitgelieferten DNA (Positivkontrolle) anstelle der Probe in das PCR-Gefäß pipettieren
   - 5,0 µl Rehydratisierungspuffer (Negativkontrolle) anstelle der Probe in ein weiteres PCR-Gefäß pipettieren
4. PCR-Gefäße mit Deckelstreifen (im Produkt enthalten) verschließen, Deckel nicht mit bloßen Händen berühren!
5. Optional: kurz anzentrifugieren (max. bei 2.000 U/min)

6. PCR-Gefäße in den Thermocycler stellen, dabei folgendes Temperaturprofil einstellen:
   - Volumen auf 30 µl einstellen
   - Detektoren FAM (520 nm Emission) und VIC/HEX (550 nm Emission) einstellen. Der Quencher für die interne Kontrolle ist TAMRA



: Messpunkt

*****Aktivierungszeit ist abhängig vom verwendeten Master Mix (siehe Herstellerangaben)

Auswertung

1. Kurvenverläufe kontrollieren
2. Auswertung der Ct-Werte:

FAM-Kanal detektiert Zielorganismen:

a. Ct ≤ 38: Nachweisreaktion ist positiv

b. Ct 38 – 40: Nachweisreaktion ist grenzwertig; die Kurve(n) sollten kritisch überprüft und evtl. die Probe(n) nochmals bearbeitet werden

c. Ct >40 bedeutet: Nachweisreaktion ist negativ

VIC/HEX-Kanal detektiert interne Positivkontrolle:

a. Für die interne Kontrollreaktion ist ein Ct von ≤ 35 zu erwarten

b. Falls der Ct zwischen 38 – 40 liegt und zu einer Probe mit negativen FAM Ergebnis gehört, ist die Kontrollreaktion als gehemmt / negativ zu werten

Im Falle von positiven Proben mit starken Signalen (Ct ≈ 20 - 25) kann die interne Positiv-Kontrolle einen hohen Ct-Wert zeigen oder evtl. ganz ausfallen.

Nachweisreaktion	Kontrollreaktion	Ergebnis
+	+	DNA von Lactobacillus parabuchneri ist enthalten
+	-	DNA von Lactobacillus parabuchneri ist enthalten
-	+	Keine nachweisbare DNA von Lactobacillus parabuchneri enthalten
-	-	Ergebnis nicht auswertbar: • entweder: Probenaufschluss mit geringerem Probenvolumen wiederholen und analysieren • oder: DNA in Rehydratisierungspuffer B verdünnen (1:100 bis 1:1000) und erneut analysieren

Tabelle 3: Auswertung der PCR-Ergebnisse

Ein Screening Nachweis für die gleichzeitige Detektion von *Lactobacillus backii, Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus collinoides, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus parabuchneri, Lactobacillus lindneri, Lactobacillus perolens, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rossiae*, *Pediococcus damnosus* und *Pediococcus inopinatus* ist ebenfalls erhältlich (Art. Nr. 2001-38)

PIKA Weihenstephan GmbH
Raiffeisenstraße 31A
85276 Pfaffenhofen
DEUTSCHLAND
Tel +49(08441)879 48 30
Fax +49(08441)879 48 31

www.pika-weihenstephan.de
order@ pika-weihenstephan.de

Anmerkungen: Anwendungen: Das Produkt ist ausschließlich für Forschungszwecke zu verwenden.
Schutzrechte: Die Verwendung unserer Produkte kann Schutzrechte Dritter berühren. Der Erwerb unserer Produkte beinhaltet nicht das Recht zur Durchführung der PCR oder ihre Verwendung in der Diagnostik. Wir weisen darauf hin, dass für die Anwendung unserer Applikationen in der PCR lizensiertes Zubehör (Thermocycler, Taq Polymerase) verwendet werden muss. PIKA Weihenstephan GmbH übernimmt keinerlei Verantwortung für die rechtmäßige Anwendung der Applikation; diese liegt ausdrücklich und ausschließlich beim Nutzer. **PCR:** Die Durchführung der Polymerase Chain Reaction ist patentrechtlich geschützt; für die kommerzielle Anwendung ist eine Lizenz von den Firmen Roche und/oder Applied Biosystems erforderlich. "No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressively or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501."