



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN First-Beer PCR Kit P1 Screening and hop resistance

Real-time PCR Kit zum Nachweis von
bierschädlichen Bakterien und Hopfenresistenzgenen in
bierschädlichen Bakterien ohne Probenvoranreicherung

real-time PCR kit for detection of
beer spoilage bacteria and of hop resistance genes in
beer spoilage bacteria without sample preenrichment

Art. Nr. / Order No.: QPP1HR 0050

Version 11/16

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

QuickGEN First-Beer PCR Kit

P1 Screening and hop resistance

Art. Nr.: QPP1HR 0050

(Version 11/16)

1. Beispiele erfolgreich nachgewiesener Mikroorganismen

- *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. paraplantarum*
 - L. rossiae*
- *Lactococcus lactis*
- *Megasphaera* spp.
- *Micrococcus kristinae*
- *Pectinatus* spp.
 - Pectinatus cerevisiiphilus*
 - Pectinatus frisingensis*
 - Pectinatus haikarae*
 - Pectinatus* ssp.
- *Pediococcus* spp.
 - Pediococcus acidilactici*
 - Pediococcus damnosus*
 - Pediococcus dextrinicus*
 - Pediococcus inoptinatus*
 - Pediococcus pentosaceus*
 - Pediococcus parvulus*
 - Pediococcus claussenii*

2. Verwendungszweck

Nachweis von bakteriellen Kontaminationen und gleichzeitige Identifizierung der Hopfenresistenzgene hor A und hor C als genetische Marker für bierschädliche Mikroorganismen in Bier und Biermischgetränken.

3. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; 610 oder ROX/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares *Fluoreszenzsignal* definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (660 oder 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 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix QPP1HR	weißer Deckel
1 x QPP1HR mix (lyophilisiert, inkl. IK-DNA)	dunkles Gefäß, roter Deckel
1 x ddH ₂ O (zur Aufnahme der lyophilisierten Reagenzien)	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

5. Lagerung

Der QPP1HR mix und die Control-DNA werden lyophilisiert geliefert und müssen vor Gebrauch in ddH₂O gelöst werden (siehe Punkt 7.1).

Den lyophilisierten QPP1HR 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 QPP1HR mix (roter Verschluss) enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist deshalb 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

LightCycler® 480

oder real-time PCR 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 (ddH₂O)

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

Multiwell Plates 96 oder PCR vials für das verwendete real-time PCR-Gerät

Sealing Foils

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 QPP1THR Kits durchführen

7. PCR

7.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung müssen alle lyophilisierten Komponenten kurz zentrifugiert und in ddH₂O gelöst werden:

- den lyophilisierten QPP1HR-mix in 80 µL ddH₂O aufnehmen
- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH₂O aufnehmen
- 15 Minuten lösen, dann gut mischen

Alle PCR Komponenten vor Gebrauch gut mischen und kurz abzentrifugieren.

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix QPP1HR	13,5
QPP1HR mix	1,5
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	20,0

* bei Verwendung des Simplex Easy DNA Kits: 2,5 µL DNA einsetzen

1. Den Mastermix aus Premix und QPP1HR 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-Reaktionsgefäße aufteilen.
4. 5 µL* Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben und gegebenenfalls mit ddH₂O auf 5 µL ergänzen; für die PCR-Positivkontrolle 5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 5 µL DNA und für die PCR-Negativkontrolle 5 µL steriles ddH₂O pipettieren (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln).
5. Die PCR-Reaktionsgefäße verschließen, zentrifugieren und in das real-time Gerät stellen.

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. QPP1HR
4. Im Fenster **Filter Combination Selection** die folgenden Filterkombinationen ankreuzen: 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 fact	Max. Integ. Time
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)
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

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.	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	
Cooling	15 sec	40 °C	

8. Auswertung

Die Auswertung wird entsprechend der für das real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (siehe Herstellerangaben).

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)

hor A und hor C: 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.

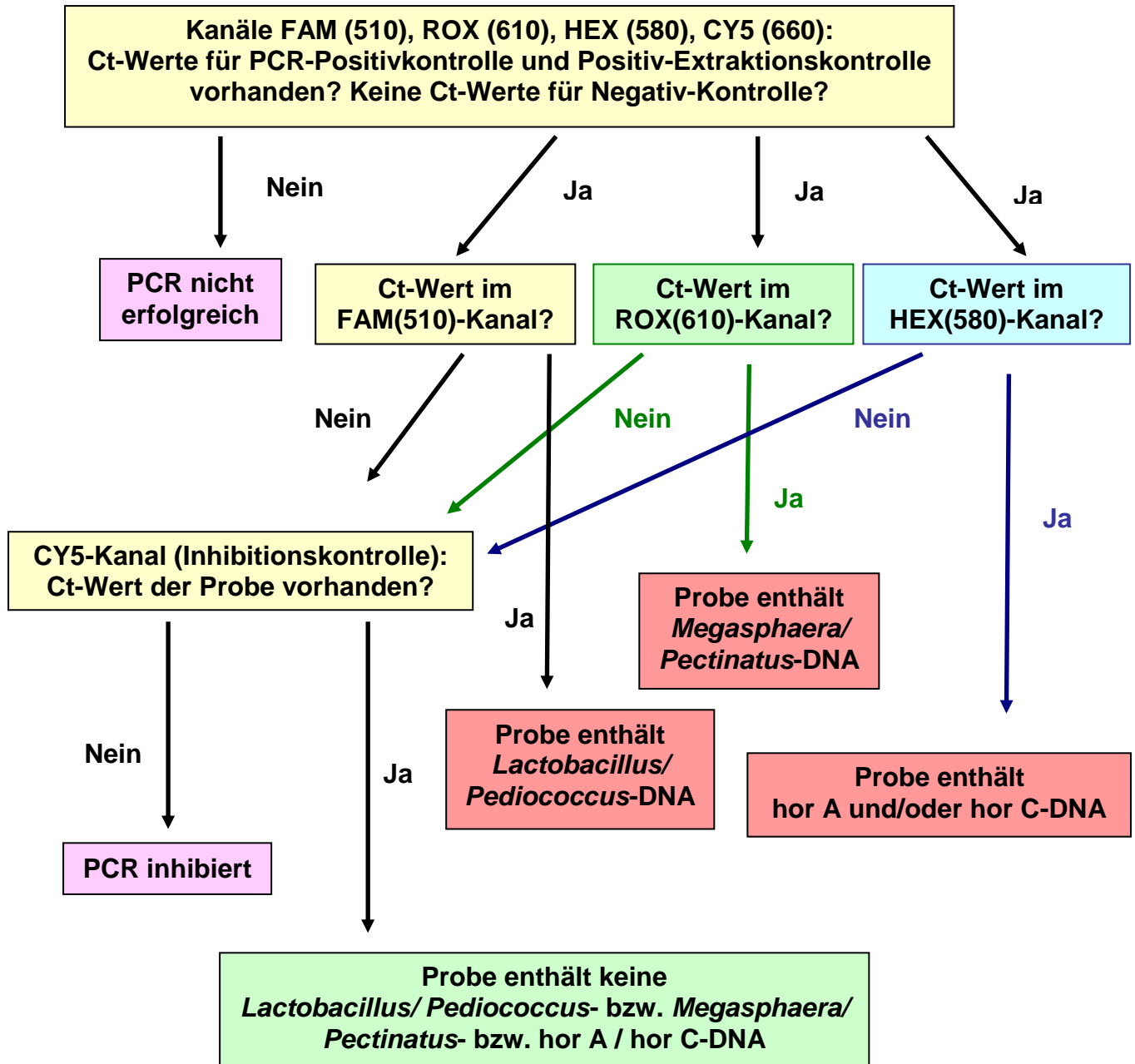
Eine Probe wird als ***Megasphaera/Pectinatus*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ROX-Kanal (533-610 nm)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-Kanal (618-660 nm) kann im Probenansatz positiv oder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

Eine Probe wird als **hor A** und/oder **hor C** 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 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-Beer PCR Kit

P1 Screening and hop resistance

Order No.: QPP1HR 0050

(Version 11/16)

1. Examples of successful detected microorganisms

- *Lactobacillus* spp.
 - L. acetotolerans*
 - L. acidophilus*
 - L. amylolyticus*
 - L. amylovorus*
 - L. backii*
 - L. brevis*
 - L. brevisimilis*
 - L. buchneri*
 - L. casei* / *paracasei*
 - L. collinoides* / *paracasei*
 - 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. paraplantarum*
 - L. rossiae*
- *Lactococcus lactis*
- *Megasphaera* spp.
- *Micrococcus kristinae*
- *Pectinatus* spp.
 - Pectinatus cerevisiiphilus*
 - Pectinatus frisingensis*
 - Pectinatus haikarae*
 - Pectinatus* ssp.
- *Pediococcus* spp.
 - Pediococcus acidilactici*
 - Pediococcus damnosus*
 - Pediococcus dextrinicus*
 - Pediococcus inoptinatus*
 - Pediococcus pentosaceus*
 - Pediococcus parvulus*
 - Pediococcus claussenii*

2. Intended use

Qualitative detection of bacterial contaminations and the hop resistance genes *hor A* and *hor C* as genetic markers for beer-spoilage microorganisms in beer and beer mixes.

3. Test principle

The TaqMan[®] real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; HEX- or JOE/DQ; 610 or 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 (660 or 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 reactions:

1 x Premix QPP1HR	white cap
1 x QPP1HR mix (freeze-dried, incl. IC-DNA)	dark vial, red cap
1 x ddH ₂ O	colourless cap
1 x Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

5. Storage conditions

The QPP1HR mix and the Control-DNA are freeze-dried, they have to be solved in ddH₂O prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized PCR 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 QPP1HR 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

LightCycler™ 480 or real-time PCR machine with channels FAM, HEX (JOE), ROX and CY5

Standard benchtop mini-centrifuge (1.5 – 2.0 mL vials)

Centrifuge for multiwell plates or stripes

Pipettes

“Vortex”

6.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

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®, PP1T CC LC480 0005)

Use a Colour compensation prior to first use of QPP1HR Kit!

7. PCR

7.1. PCR-Setup

Preparations before first use:

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 ddH₂O to freeze-dried QPP1HR mix
- 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.

PCR-reaction Setup:

PCR-Components	volume (μL)
Premix QPP1HR	13.5
QPP1HR mix	1.5
Sample-DNA	5.0*
Total volume	20.0

* if using the Simplex easy DNA kit: add 2.5 μL DNA

1. Prepare a mastermix by mixing Premix and QPP1HR 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 the sample DNA using a fresh tip with each DNA filling and mix it with the mastermix at the same time, (with DNA volume less than 5 μL add ddH₂O to the end volume of 20 μL per reaction). Add 5 μL of the Control-DNA, 5 μL extraction control and 5 μL of ddH₂O for the negative control reaction.
5. Close the tubes immediately and centrifuge them according to the recommendations of the real-time PCR instrument manual.
6. Place tubes/plate/capillaries into the thermo block/carousel of the instrument, close lid and start run.

Work swiftly to avoid warming up and keep away from light.

7.2 PCR-Program (LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP1):

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: QPP1HR
4. Open the window **Filter Combination Selection** and choose the following filter combinations: 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
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)
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**

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.	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	60 °C	
Cooling	15 sec	40 °C	

8. Evaluation

The evaluation has to be made according to the data analysis program recommended by the real-time instrument manufacturer.

For LC480: Activate Colour Compensation

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

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

Hor A and Hor C: HEX-channel (LC480: 533-580 nm)

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

A sample is ***Lactobacillus/Pediodoccus* 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.

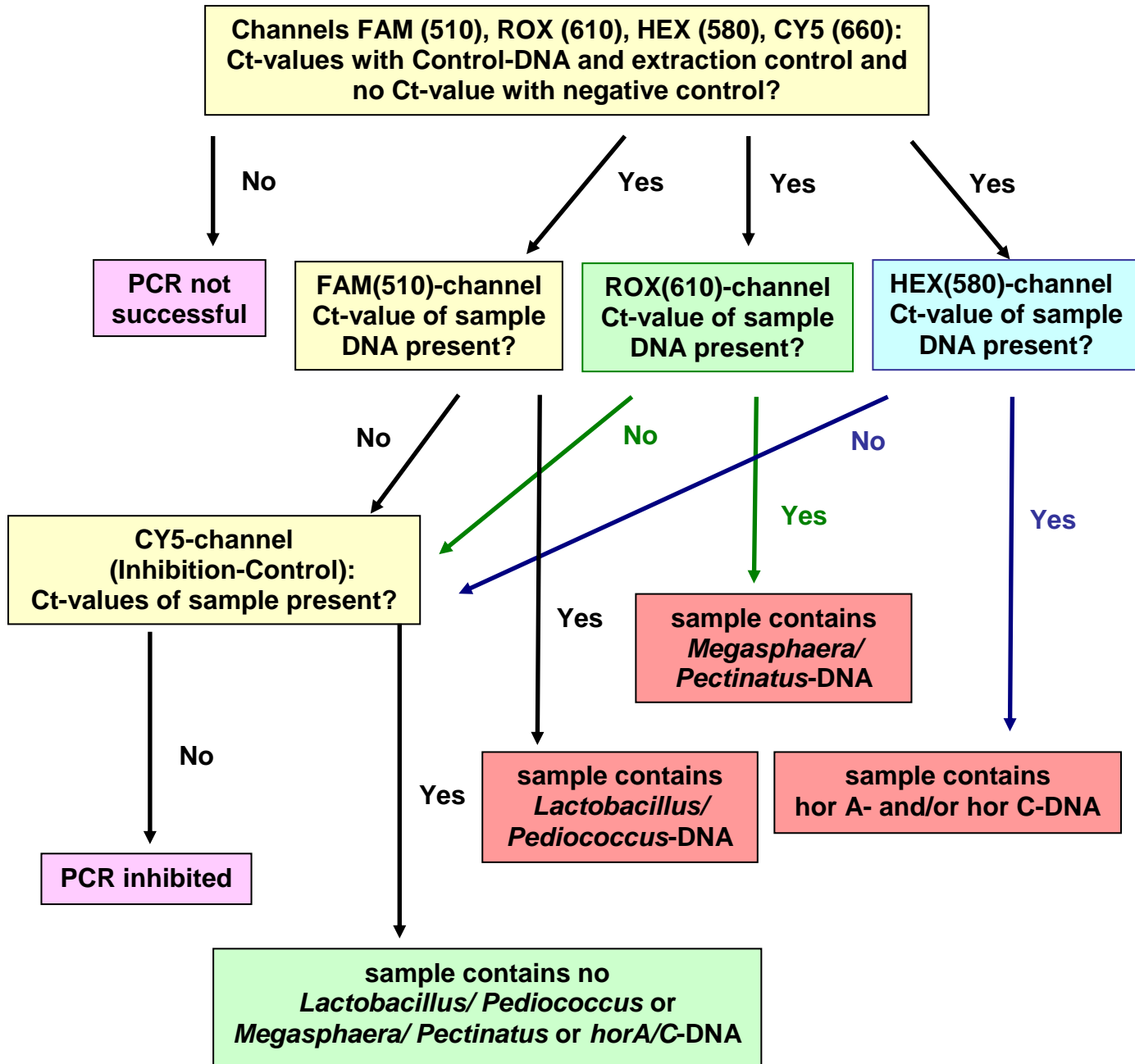
A sample is ***Megasphaera/ Pectinatus* positive**, if there is a detectable fluorescence increase in the **ROX-channel (533-610 nm)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-channel (618-660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