

HybriScan® *I Leuconostoc*

**Molekularbiologisches Schnelltestsystem
zur Identifizierung von Bakterien der Gattung
*Leuconostoc***

Produkt-Nr.: 77007



Kontaktinformationen:

HybriScan® - Schnelltestsystem (F&E)

Dr. Helmut Maucher
Phone: (+49) – 3494 – 6364 15
e-mail: contact@scanbec.de

Verkauf

Germany
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Free Tel: 0800 51 55 000
Free Fax: 0800 64 90 000
Tel: (+49) 89 6513 0
Fax: (+49) 89 6513 1160

Austria
SIGMA-ALDRICH HANDELS GmbH
Tel: (+43) 1 605 81 90
Fax: (+43) 1 605 81 20

Switzerland
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Free Tel: 0800 80 00 80
Free Fax: 0800 80 00 81
Tel: (+41) 81 755 2828
Fax: (+41) 81 755 2815

Technischer Service
flukatec@sial.com

Produktspezifikationen

Kat. – No.:	77007
Anzahl der Tests:	48 Bestimmungen
Lagerung:	4–8°C, Haltbarkeit 12 Monate
Testdauer:	ca. 1 Stunde
Spezifität:	<i>Leuconostoc</i> spp.

HybriScan®*I* *Leuconostoc*-Testdurchführung

Testprinzip

HybriScan®*I* *Leuconostoc* ist ein molekularbiologisches Schnelltestsysteem zur Identifizierung von Bakterien der Gattung *Leuconostoc*. HybriScan®*I* *Leuconostoc* beruht auf dem Nachweis von Mikroorganismen-spezifischen Zielmolekülen mit Hilfe spezieller Fänger- und Nachweissonden durch eine so genannte Sandwich-Hybridisierung. Die in der Probe enthaltenen Zielmoleküle werden durch eine Fängersonde an die Oberfläche der Bindeplatte gebunden. An die ebenfalls an das Zielmolekül gebundene Nachweissonde wird in einem weiteren Inkubationsschritt ein Enzym gekoppelt. Alle nicht gebundenen Bestandteile werden durch Waschschrirte entfernt, so dass ganz spezifisch nur *Leuconostoc* erfasst wird. Danach erfolgt durch Zugabe eines Farbsubstrates eine blaue Farbreaktion, die nach dem Abstoppen nach gelb umschlägt. Die Auswertung der Messwerte erfolgt photometrisch durch Absorptionsmessung bei 450 nm.

Technische Hinweise

Nach Beginn der Testdurchführung sind alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der angegebenen Zeitgrenzen durchzuführen.

Für jede Probe ist eine separate Einmal-Pipettenspitze zu verwenden, um Verschleppungen bzw. Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien die Flaschen wieder verschließen. Dabei darauf achten, dass die Verschlüsse nicht verwechselt werden. Reagenzien nach Benutzung wieder bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur lagern.

Proben und Standards müssen gleichzeitig getestet werden, um gleiche Bedingungen und eine genaue Auswertung zu ermöglichen. Komponenten von Testkits verschiedener Chargen sollten nicht ausgetauscht oder miteinander gemischt werden. Inkubation bei Raumtemperatur bezieht sich auf eine Labortemperatur von 20 bis 25°C. Der Testkit sollte nach dem Verfallsdatum nicht mehr angewendet werden.

Sicherheitshinweise

Sämtliche im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für *in vitro* Zwecke verwendet werden. Im Labor darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.

Testlösung D enthält Formamid. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten, sowie das Einatmen vermeiden. Im Notfall bei Hautkontakt mit ausreichend Wasser und Seife spülen bzw. nach dem Einatmen Betroffenen an die frische Luft bringen. Ggf. Arzt konsultieren.

Den Kontakt der Stopplösung H (0,50 mol/l Schwefelsäure) mit Haut und Schleimhäuten vermeiden, da sie Hautirritationen oder Verätzungen hervorrufen kann. Im Notfall den betroffenen Hautbereich mit ausreichend Wasser abspülen. Der Umgang und die Entsorgung sollten entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien erfolgen.

Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien sind ausreichend für 48 Bestimmungen.

Die Kitkomponenten sollten, wie auf den Etiketten angegeben, bei +2 bis +8°C gelagert werden. Der Testkit darf auf keinen Fall eingefroren werden.

Kitkomponenten:

1. Bindeplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig, Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wiederverschlossenen Originalpackung aufbewahrt werden.	1 Stk
2. Negativkontrolle^{a)} (weißer Schraubdeckel), gebrauchsfertig	0,2 ml
3. Lysisreagenz A (roter Deckel), gebrauchsfertig	1,0 ml
4. Lysispuffer B^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	4,5 ml
5. Lysispuffer C^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	5,5 ml
6. Testlösung D1 und D2 (gelber Deckel), gebrauchsfertig	5,0 ml
7. Waschlösung E^{b)} (blauer Deckel), gebrauchsfertig	90,0 ml
8. Enzymlösung F (grüner Deckel), vor Gebrauch benötigte Menge 1:100 mit Waschlösung E verdünnen	0,140 ml
9. Substratlösung G^{b)} (grüner Deckel), gebrauchsfertig	10,0 ml
10. Stopplösung H (grüner Deckel) 0,50 mol/l Schwefelsäure, gebrauchsfertig	5,0 ml
11. Glasbeads (farbloser Deckel), steril, gebrauchsfertig	4,0 ml

^{a)} Komponenten enthalten SDS, welches bei niedrigen Temperaturen ausfallen kann. Vor Nutzung auf Raumtemperatur äquilibrieren.

^{b)} Vor Nutzung auf Raumtemperatur äquilibrieren.

Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße (1,5 bzw. 2 ml), max. Drehzahl 13.300 U/min
- Thermomixer für Mikroreaktionsgefäße und Mikrotiterplatten, temperierbar
- Mikrotiterplatten - Photometer
- 3 Pipetten (2–20 µl, 20–200 µl und 200–1.000 µl) mit entsprechenden Spitzen, optional: Mehrkanalpipette (20–200 µl), Reagenzien-Reservoirs
- Mikroreaktionsgefäße (2 ml)

Testdurchführung

(1) Probennahme

Überführen Sie eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte in ein 2 ml-Reaktionsgefäß, in welchem bereits Glasbeads, 40 µl Lysispuffer B (roter Deckel) sowie 10 µl Lysispuffer A (roter Deckel) enthalten sind. Resuspendieren Sie die Bakterien in der Lösung.

(2) Zelllyse

Stellen Sie die Proben für 8 Minuten bei 37°C in den vorgeheizten Thermomixer. Fügen Sie anschließend 50 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel) dazu und schütteln Sie die Proben bei 37°C und 1.400 rpm für weitere 8 Minuten auf dem Thermomixer. Zentrifugieren Sie die Proben nun 5 Minuten bei 13.000 rpm.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Während die Proben zentrifugieren, tauschen Sie die Aufsätze für den Thermomixer und fixieren Sie den Block für Mikrotiterplatten. Stellen Sie den Thermomixer auf 50°C und 500 rpm ein. Pipettieren Sie für jede Probe jeweils 45 µl Testlösung D1 und jeweils 45 µl Testlösung D2 in je eine, separate Vertiefung der Bindeplatte. Für die Negativkontrolle befüllen Sie zusätzlich eine Position mit 45 µl Testlösung D1 und eine Position mit 45 µl Testlösung D2. Stellen Sie die befüllte Platte mit dem Deckel auf den Thermomixer und lassen Sie die Testlösung für mindestens 5 Minuten bei 50°C und 500 rpm vortemperieren. Vermerken Sie die Beladung der einzelnen Positionen mit der jeweiligen Testlösung und die nachfolgende Zugabe der entsprechenden Probe ggf. in Ihrem persönlichen Protokoll. Für die spätere Auswertung ist die Kombination von Testlösung und Probe für die jeweilige Position sehr wichtig, nur so lässt sich eine genaue Identifizierung vornehmen.

Hinweise:

Entnehmen Sie das Lysisreagenz nur für den unmittelbaren Gebrauch.

Bei einer größeren Anzahl von Proben kann man zur Einsparung von Pipettierschritten die entsprechende Menge an Lysisreagenz A und Lysispuffer B unmittelbar vor der Zelllyse in einem separaten Gefäß vereinen und entsprechend 50 µl einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

(3) Hybridisierung

Nehmen Sie die **Negativkontrolle** aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie je 10 µl zur Testlösung D1 und D2.

Entnehmen Sie nun 10 µl aus dem Überstand der lysierten Probe aus Schritt (2) und pipettieren Sie diese in die 45 µl **Testlösung D1** der vorgesehenen Position. Entnehmen Sie weitere 10 µl der gleichen Probe und pipettieren Sie diese in **Testlösung D2**. Inkubieren Sie nun die Platte für 15 Minuten bei 50°C und 500 rpm.

Hinweise:

Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Bindeplatte mit der Testlösung verbleibt während der Zugabe der Proben auf dem Thermomixer, um eine Abkühlung der Testlösung zu vermeiden.

Die verbliebene Probe kann ggf. für spätere Tests bei -20°C eingefroren werden.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro Probe (inklusive Negativkontrolle) eine Menge von 100 µl der Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen in dieser in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1 : 100. Beispiel: Für 8 Proben (insgesamt 16 Positionen) benötigen Sie 1600 µl Waschlösung plus 16 µl Enzymlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10 % mehr zu.

(4) Enzymbindung

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung durch Invertieren und leichtes Ausklopfen der Platte. Stellen Sie in der Zwischenzeit den Thermomixer auf 25°C ein. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie 2 min bei Raumtemperatur auf der Laborbank. Entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Pipettieren Sie jeweils 100 µl verdünnte Enzymlösung, bestehend aus **Enzymlösung F** (grüner Deckel) und **Waschlösung E** (blauer Deckel) 1:100 verdünnt, in jede Vertiefung. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Hat der Thermomixer auf eine Temperatur von mindestens 30°C runtergekühlt, kann die Platte in den Thermomixer gestellt werden. Es wird nun für 10 Minuten bei eingestellten 25°C und 500 rpm inkubiert.

Hinweise:

Die verdünnte Enzymlösung muss für jeden Test frisch angesetzt und kann in dieser Form nicht über längere Zeit gelagert werden. Nehmen Sie die Enzymlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank. Zentrifugieren Sie vor der Entnahme der Enzymlösung das Gefäß kurz, um die Lösung am Gefäßboden zu konzentrieren.

(5) Waschen

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie die Platte 1 Minute bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer. Entfernen Sie nachfolgend die Waschlösung und wiederholen den Waschvorgang noch einmal.

Vorbereitung weitere Schritte:

Schalten Sie das Lesegerät ein und starten Sie den Computer.

(6) Farbreaktion

Pipettieren Sie nun in jede Vertiefung 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel). Stellen Sie die Platte zurück auf den Thermomixer. Lassen Sie die Platte bei 25°C und 500 rpm mit geschlossenem Deckel schütteln. Bereits nach wenigen Minuten ist eine Blaufärbung in kontaminierten Proben sichtbar. Nach 2-15 Minuten (im D1-Ansatz ist eine deutliche Blaufärbung zu erkennen, unabhängig von der Farbintensität im Ansatz D2) werden alle Reaktionen durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung H** abgestoppt. Man kann nach Zugabe der Stopplösung einen Farbumschlag nach gelb beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen auf den Thermomixer und schütteln Sie ca. 10 Sekunden bei 500 rpm. Achten Sie darauf, dass evtl. entstandene Luftblasen entfernt werden müssen.

(7) Auswertung der Messergebnisse mit dem VIS-Photometer

Schalten Sie das Lesegerät und Ihren angeschlossenen Rechner mit der installierten Software ein. Öffnen Sie die Software. Stellen Sie die Platte in das Lesegerät. Die Position A1 befindet sich hinten links. Starten Sie die Messung bei 450nm. Das Lesegerät misst nun die Absorption auf allen Positionen der Platte.

(8) Auswertung der Messergebnisse

Sie können nun den Quotienten aus den Messsignalen der Testlösung D1 und Testlösung D2 jeder einzelnen Probe berechnen. Die Kolonie wurde als *Leuconostoc* identifiziert, wenn der Quotient nicht größer als 2 ist.

Beispiel: Messwert Testlösung D1: 1,045/Testlösung D2: 0,782 ergibt 1,33.

Das mit der Testlösung D1 gemessene Signal spiegelt den Gehalt an Bakterien im Messansatz wider. Für eine gültige Auswertung sollten die für die Testlösung D1 gemessenen Signale größer als 0,2, der Absorptionswert für die Negativkontrolle kleiner 0,1 sein. Das mit der Testlösung D2 gemessene Signal erfasst spezifisch *Leuconostoc*-Zellen.

Kurzprotokoll

1. Resuspendieren einer Einzelkolonie in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit Glasbeads und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) sowie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel); 8 min bei 37 °C im Thermoshaker inkubieren
2. Zugabe von 50 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel); 8 min bei 37°C und 1.400 rpm im Thermoshaker schütteln
3. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
4. Pro Probe je 45 µl **Testlösung D1 und D2** (gelber Deckel) in die Vertiefungen der Bindeplatte pipettieren und ca. 5 min bei 500 rpm auf 50°C im Thermoshaker vortemperieren
5. 10 µl Überstand aus Schritt 3 dazu pipettieren; Bindeplatte abdecken und 15 min bei 50°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
6. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) waschen
7. Bindeplatte entleeren und 100 µl Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren und 10 min bei 25°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
8. Mikrotiterplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und erneut waschen
9. Je Probe (inkl. Negativkontrolle) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren; Mikrotiterplatte abdecken und 2-15 min bei 25°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
10. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
11. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung

So funktioniert's



1. Probenaufschluss & Anreicherung,
(optional Plattieren)



2. Zell-Lyse
(2 ml Probe oder
Bakterienkolonie)



3. Hybridisierung & Immobilisierung
(Bindung spezifischer Sonden
an die Probe im Zell-Lysat,
15 min)



4. Waschen
(Entfernen ungebundener
Komponenten, 2 min)



5. Enzymreaktion
(Kopplung des Enzyms an die
Komplexe, 10 min)



6. Waschen
(Entfernen ungebundener
Komponenten, 2x 1min)



7. Farbreaktion
(Farbreaktion und
Abstoppen, 2-15 min)



**8. Messsignal fotometrisch
auslesen**

Vorteile

- schnell, sensitiv, zuverlässig
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik