

HybriScan® D Getränke

**Molekularbiologisches Schnelltestsyst^{em}
zum qualitativen Nachweis von Bakterien und
Hefen in alkoholfreien Getränken**

Produkt-Nr.: 68301



Kontaktinformationen:

HybriScan® - Schnelltestsystem (F&E)

Dr. Helmut Macher
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. – Nr.:	68301
Anzahl der Tests:	96 Bestimmungen, inkl. Standardreihen
Lagerung:	4–8°C; Haltbarkeit 12 Monate
Testdauer:	ca. 2 - 2,5 Stunden (nach Voranreicherung)
Sensitivität:	1 - 10 KBE/l (nach Voranreicherung)
Spezifität:	Mit HybriScan® D Getränke können u.a. Hefearten der Gattungen <i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosacchomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , <i>Torulaspora</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> und generelle eubakterielle Verunreinigungen wie Milchsäure- und Essigsäurebakterien sowie Bakterien der Gattung <i>Alicyclobacillus</i> nachgewiesen werden.

HybriScan®D Getränke-Testdurchführung

Testprinzip

HybriScan®D Getränke ist ein molekularbiologisches Schnelltestverfahren zum qualitativen Nachweis mikrobieller Schadorganismen in filtrierbaren Säften und anderen alkoholfreien Getränken. HybriScan®D Getränke beruht auf dem Nachweis Mikroorganismen-spezifischer Zielmoleküle mit Hilfe spezieller Fänger- und Nachweissonden durch eine so genannte Sandwich-Hybridisierung. Die in der Probe enthaltenen Zielmoleküle der Kontaminanten 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 Waschschriffe entfernt, so dass ganz spezifisch nur mikrobielle Schadorganismen erfasst werden. 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 durch Vergleich mit den im Testkit enthaltenen Standardlösungen.

Technische Hinweise

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

Für jede Probe eine separate Einmal-Pipettenspitze 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. Testkit nach dem Verfallsdatum nicht mehr anwenden.

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 96 Bestimmungen inkl. 6 Standardreihen.

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. Mikrotiterplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig	1 Stk
2. Bindeplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung aufbewahrt werden.	1 Stk
3. Standards 1 & 2^{a)} (weiße Schraubdeckel); Standard 1 als Leerwert (Negativkontrolle) und Standard 2 als Positivkontrolle, gebrauchsfertig	je 0,2 ml
4. Lysisreagenz A (roter Deckel), gebrauchsfertig	1,2 ml
5. Lysispuffer B^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	4,5 ml
6. Lysispuffer C^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	5,5 ml
7. Testlösung D (gelber Deckel), gebrauchsfertig	4,5 ml
8. Waschlösung E^{b)} (blauer Deckel), gebrauchsfertig	90 ml
9. Enzymlösung F (grüner Deckel), vor Gebrauch benötigte Menge 1:100 mit Waschlösung E verdünnen	0,120 ml
10. Substratlösung G^{b)} (grüner Deckel), gebrauchsfertig, vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperieren	10 ml
11. Stopplösung H (grüner Deckel) 0,50 mol/l Schwefelsäure, gebrauchsfertig	5 ml
12. Glasbeads (farbloser Deckel), steril, gebrauchsfertig	4 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

- 3 Pipetten (2–20 µl, 20–200 µl und 200 µl–1.000 µl) mit entsprechenden Spitzen, optional: Mehrkanalpipette (20–200 µl)
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße (1,5 bzw. 2 ml), max. Drehzahl ca. 13.300 U/min
- Thermomixer mit Aufsatz für Mikroreaktionsgefäße und Mikrotiterplatten, temperierbar
- Mikrotiterplatten-Photometer
- Anreicherungsmedium, Brutschrank
- Mikroreaktionsgefäße (2 ml), Kultivierungsröhrchen (12 ml), Reagenzien-Reservoirs
- Optional: Vakuum-Filtrationsanlage, Pinzette, Membranfilterscheiben (0,45 µm)

Testdurchführung

(1) Probennahme

Nehmen Sie für jede Probe ein 2 ml-Reaktionsgefäß und geben Sie in jedes Gefäß eine Spatelspitze Glasbeads. Entnehmen Sie Ihrer vorkultivierten Probe eine Menge von 2 ml und füllen diese in das vorbereitete Reaktionsgefäß. Zentrifugieren Sie die Probe für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Hierdurch werden mögliche Hefen und Bakterien sedimentiert. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium. Fahren Sie nun mit Punkt 2 (Zelllyse) fort.

Hinweise:

Vermeiden Sie starke Erschütterungen der Probe nach dem Zentrifugieren. Starke Erschütterungen können dazu führen, dass sich die sedimentierten Hefen und Bakterien von der Gefäßwand lösen. Zentrifugieren Sie ggf. ein zweites Mal. Bedenken Sie, dass ein Zellpellet bei geringer Kontamination meist nicht sichtbar ist!

(2) Zelllyse

Pipettieren Sie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe, mischen Sie die Reagenzien durch kurzes Schütteln und stellen Sie die Proben für 15 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 15 Minuten auf dem Thermomixer. Zentrifugieren Sie die Proben nun 10 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 D in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Befüllen Sie zusätzlich mindestens zwei Positionen der Mikrotiterplatte mit je 45 µl Testlösung D für das Mitführen der Standards 1 und 2 (vier Positionen bei Doppelbestimmung). Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. 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.

Benutzen Sie für jede Nachweisreaktion eine neue, unbenutzte Position ihrer Mikrotiterplatte!

Hinweise:

Entnehmen Sie das Lysisreagenz nur für den unmittelbaren Gebrauch.

Bei einer größeren Anzahl von Proben kann man zur Erleichterung der Pipettierschritte die entsprechende Menge an Lysisreagenz A und Lysispuffer B unmittelbar vor der Zelllyse in einem separaten Gefäß vereinen und entsprechend jeweils 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 **Standards 1** und **2** aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie je 10 µl Standard zur Testlösung D in den festgelegten Positionen einer Reihe. Beispiel für eine Doppelbestimmung: je 10 µl **Standard 1**: Position A1 und B1, je 10 µl **Standard 2**: Position C1 und D1.

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

Hinweis:

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

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

(4) Bindung an die Bindeplatte

Überführen Sie 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte in die entsprechenden Vertiefungen der Bindeplatte und lassen Sie die Platte mit den Proben weitere 10 Minuten bei 50°C und 500 rpm auf dem Thermomixer schütteln.

Hinweise:

Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung im Kühlschrank bei ca. 4°C aufbewahrt werden.

Vorbereitung weitere Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro Probe (inklusive Standards) eine Menge von 100 µl der Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen darin in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 8 Proben und 4 Standards benötigen Sie 1.200 µl Waschlösung plus 12 µl Enzymlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10% mehr zu.

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) Enzymbindung

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung durch Invertierung 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 Minuten 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 heruntergekühlt, kann die Platte in den Thermomixer gestellt werden. Es wird nun für 10 Minuten bei eingestellten 25°C und 500 rpm inkubiert.

(6) 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.

(7) 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 schütteln. Bereits nach 10 - 20 Minuten ist eine Blaufärbung in kontaminierten Proben sichtbar. Vergleichen Sie die Intensität der Färbung mit der des Standards 1. Ist im Standard 2 im Vergleich zu Standard 1 eine schwache Blaufärbung deutlich sichtbar, können alle Reaktionen gleichzeitig durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung H** abgestoppt werden. Man kann nach Zugabe der Stopplösung einen Farbumschlag nach gelb beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen kurz auf den Thermomixer und lassen Sie ca. 10 Sekunden bei 500 rpm mixen. Achten Sie darauf, dass evtl. entstandene Luftblasen entfernt werden müssen.

(8) 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.

(9) Qualitative Auswertung

Für eine gültige Messung soll der Quotient, ermittelt aus dem MW der Positivkontrolle (S2) dividiert durch den MW der Negativkontrolle (S1), einen Wert größer als 4 ergeben.

Die Beurteilung der Proben erfolgt auf der Grundlage folgender Formel:

$$\text{Proben-OD\%-Wert} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW}_{\text{OD}_{\text{NK}}}}{\text{MW}_{\text{OD}_{\text{PK}}} - \text{MW}_{\text{OD}_{\text{NK}}}} \times 72,1 \text{OD\%}$$

MW Mittelwert

PK Positivkontrolle (S2)

NK Negativkontrolle (S1)

Für eine aussagekräftige Beurteilung der Proben sind die erhaltenen Proben-OD%-Werte wie folgt zu bewerten:

Proben mit einem Proben-OD%-Wert kleiner als 10 gelten als negativ.

Proben mit einem Proben-OD%-Wert von 10 bis < 20 gelten als fraglich.

Proben mit einem Proben-OD%-Wert ≥ 20 gelten als positiv.

Kurzprotokoll

1. 100 – 1.000 ml Probe filtrieren (Vakuumfiltrationsanlage; Membranfilterscheibe, 0,45 µm Porendurchmesser)
2. Filterscheibe in 5 ml Anreicherungsmedium inkubieren (28°C, ca. 24 Stunden)
3. 2 ml Probe aus Anreicherungsmedium entnehmen und eine Spatelspitze Glasbeads zugeben, zentrifugieren (13.000 rpm, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen und werfen
4. Pellet in 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren; mischen und 15 min bei 37°C im Thermomixer inkubieren
5. 50 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel); 15 min bei 37°C und 1.400 rpm im Thermoshaker inkubieren
6. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
7. Pro Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren und ca. 5 min bei 500 rpm bei 50°C im Thermomixer vortemperieren
8. 10 µl Überstand aus Schritt 6 bzw. Standard dazu pipettieren; Mikrotiterplatte abdecken und 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
9. Überführen von 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung in die Bindeplatte, 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
10. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung pipettieren und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
11. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 100 µl Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren; 10 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
12. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und erneut waschen
13. Je Probe (inkl. Standards) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Bindeplatte pipettieren; Platte abdecken und ca. 15 min bei 25°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
14. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
15. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm

So funktioniert's



1. Probe filtrieren
(250 – 1000 ml AfG,
15 min)



2. Filter inkubieren
(optional)



3. Zell-Lyse
(2 ml Probe, 13.000 rpm;
37°C, 45 min)



4. HybriScan®-Testlösung
(Binden der Probe an
spezifische Sonden, 10 min)



5. Immobilisierung
(Binden des „Sandwichs“ an
Affinitätsplatte, 10 min)



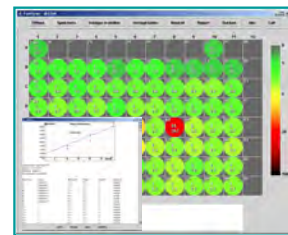
6. Enzymreaktion
(Kopplung des Enzyms an das
„Sandwich“, 10 min)



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



8. Meßsignal auslesen



9. Auswerten

Vorteile

- gleichzeitiger Nachweis von Hefen und Bakterien
- spezifisch für lebende Zellen
- Zeitersparnis von 3-5 Tagen im Vergleich zu Plattentests
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik