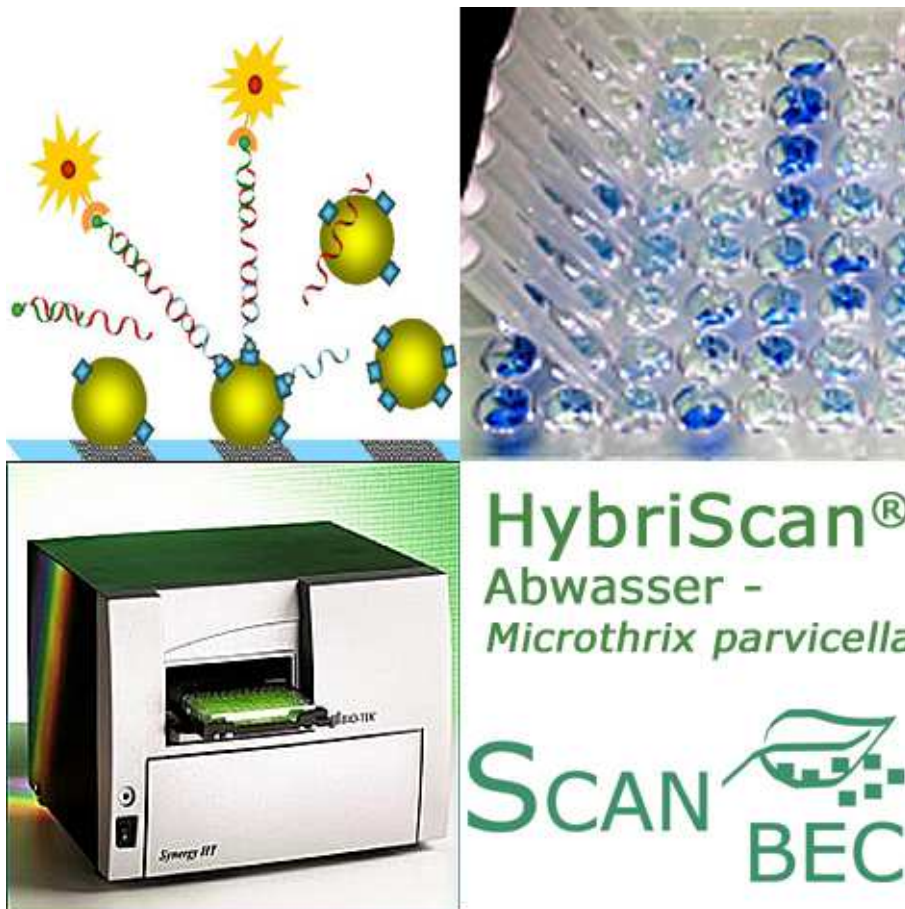


HybriScan® D Abwasser Modul II *Microthrix parvicella*

**Molekularbiologisches Schnelltestsyst^{em}
zum Nachweis von Bakterien im Abwasser**

Produkt-Nr.: 04447



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

Cat. – No.:	04447
Anzahl der Tests:	96 Bestimmungen, inkl. Standards
Lagerung:	4–8°C; Haltbarkeit: 12 Monate
Testdauer:	ca. 1-1,5 Stunden
Spezifität:	<i>Microthrix parvicella</i>

HybriScan®D Abwasser-*Microthrix parvicella*

Testprinzip

HybriScan®D Abwasser ist ein molekularbiologisches Schnelltestsystem zum Nachweis von Bakterien im Abwasser. Es ist in verschiedene Module unterteilt. Mit Hilfe von Modul I (Produkt-Nr.: 78436) kann die im Abwasser enthaltene Gesamtkeimzahl an Bakterien bestimmt werden. Modul II dient dem Nachweis von *Microthrix parvicella* in Abwasserproben. Das Testsystem beruht auf dem Nachweis von *Microthrix parvicella*-spezifischen Zielmolekülen mit Hilfe spezieller Fänger- und Nachweissonden durch eine so genannte Sandwich-Hybridisierung. Die in der Probe enthaltenen Zielmoleküle von *Microthrix parvicella* werden durch eine Fängersonde an die Oberfläche einer 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 *Microthrix parvicella* 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 durch Vergleich mit den im Testkit enthaltenen Standardlösungen.

Es wird empfohlen die *Microthrix parvicella* (MP) –Analyse parallel zur Bestimmung der bakteriellen Gesamtkeimzahl (GKZ) durchzuführen. Durch eine parallele Bestimmung der Gesamtkeimzahl kann das Verhältnis der *Microthrix parvicella*-Konzentration zur bakteriellen Gesamtkeimzahl in einer Probe bestimmt werden. Weiterhin können durch die parallele Gesamtkeimzahlanalyse äußere prozessbedingte Einflussfaktoren (z.B. Regen, variabler Zufluss) bei der Datenauswertung berücksichtigt werden. Das HybriScan®D Abwasser Modul II kann jedoch auch ohne parallele Bestimmung der bakteriellen Gesamtkeimzahl als Einzeltest durchgeführt werden.

In dieser Anleitung ist die Testdurchführung sowohl mit als auch ohne parallele Bestimmung der bakteriellen Gesamtkeimzahl erläutert. Die entsprechenden Testkomponenten zum Nachweis von *Microthrix parvicella* entnehmen sie bitte HybriScan®D Abwasser Modul II und im Bedarfsfall zur Gesamtkeimzahlbestimmung HybriScan®D Abwasser Modul I.

Technische Hinweise

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

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

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

Proben und Standards sollten 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 darf nicht nach dem Verfallsdatum 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 ist zu vermeiden. Im Notfall bei Hautkontakt mit ausreichend Wasser und Seife spülen bzw. nach dem Einatmen Betroffenen an die frische Luft bringen und ggf. einen 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.

Vorteile

- kultivierungsunabhängig
- schnell, sensitiv, zuverlässig
- spezifisch für *Microthrix parvicella*
- quantitativ
- spezifische Erfassung lebender Zellen
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik

Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Testreaktionen, inkl. entsprechender Standardreaktionen.

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

Kitkomponenten:

1. Bindeplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig, Die unbenutzten Mikrotiterstreifen müssen sorgfältig verschlossen aufbewahrt werden.	1 Stk
2. Standards ^{a)} (weiße Schraubdeckel); S1-MP, S2-MP , gebrauchsfertig	je 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	50 ml
6. Testlösung D-MP (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	0,120 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	8,0 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, temperierbar
- Mikrotiterplatten-Photometer
- 3 Pipetten (2–20 µl, 20–200 µl und 200 µl–1 ml) mit entsprechenden Spitzen, optional: Mehrkanalpipette (20–200 µl)
- Mikroreaktionsgefäße (2 ml), Reagenzien-Reservoirs

Testdurchführung

Bestimmung von *Microthrix parvicella* mit paralleler Gesamtkeimzahlbestimmung

Zusätzlich benötigte Materialien: HybriScanD Abwasser Modul I Gesamtkeimzahlbestimmung, Produkt-Nr.: 78436

(1) Probennahme

Nehmen Sie für jede Probe ein 2ml-Reaktionsgefäß. Entnehmen Sie der gut durchmischten Probe ein Volumen von 100 µl und füllen dieses in das vorbereitete Reaktionsgefäß. Zentrifugieren Sie die Probe für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Durch den Zentrifugationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Bakterien sedimentiert. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium (Überstand). 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 Mikroorganismen von der Gefäßwand lösen. Zentrifugieren Sie ggf. ein zweites Mal.

(2) Zelllyse

Pipettieren Sie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe und geben Sie in jedes Gefäß zwei Spatelspitzen Glasbeads, mischen Sie die Reagenzien durch kurzes Schütteln. Stellen Sie danach die Proben für 15 min bei 1.400 rpm und 37°C in den vorgeheizten Thermomixer. Geben Sie anschließend 450 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 maximaler Geschwindigkeit.

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 50 µl einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

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 den Standard S1-GKZ 45 µl Testlösung D-GKZ in Vertiefung A1 der Mikrotiterplatte, für Standard S2-GKZ 45 µl Testlösung D-GKZ in Vertiefung B1, für Standard S1-MP 45 µl Testlösung D-MP in Vertiefung A2 sowie für Standard S2-MP 45 µl Testlösung D-MP in Vertiefung B2 (siehe Pipettierschema für Einfachbestimmungen). Pipettieren Sie für jede Probe laut Pipettierschema für Einfachbestimmungen jeweils 45 µl Testlösung D-MP und jeweils 45 µl Testlösung D-GKZ in jeweils eine der verbleibenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Zur Vermeidung von Fehlern (z. B. Volumenfehlern) empfiehlt es sich, eine Doppelbestimmung der Proben und der entsprechenden Standards vorzunehmen (siehe Pipettierschema für Doppelbestimmung). Stellen Sie danach 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 Meßposition für den „MP“ und den „GKZ“-Wert jeder einzelnen Probe sehr wichtig, nur so lässt sich eine genaue Datenanalyse vornehmen.

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

Pipettierschema für Einfachbestimmungen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-GKZ	S1-MP										
B	S2-GKZ	S2-MP										
C	GKZ 1	MP 1										
D	GKZ 2	MP 2										
E	GKZ 3	MP 3										
F	GKZ 4	MP 4										
G	GKZ 5	MP 5										
H	GKZ 6	MP 6										

GKZ: Gesamtkeimzahl

MP: *Microthrix parvicella*

S: Standards für **Gesamtkeimzahl** bzw. ***Microthrix parvicella***

Der Analysenwert für eine Probe setzt sich jeweils aus einem „MP“- und einem „GKZ“-Messwert zusammen (z.B. Probe 1: MP1/GKZ1)

Pipettierschema für Doppelbestimmungen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-GKZ	S1-GKZ	S1-MP	S1-MP								
B	S2-GKZ	S2-GKZ	S2-MP	S2-MP								
C	GKZ 1	GKZ 1	MP 1	MP 1								
D	GKZ 2	GKZ 2	MP 2	MP 2								
E	GKZ 3	GKZ 3	MP 3	MP 3								
F	GKZ 4	GKZ 4	MP 4	MP 4								
G	GKZ 5	GKZ 5	MP 5	MP 5								
H	GKZ 6	GKZ 6	MP 6	MP 6								

GKZ: Gesamtkeimzahl

MP: *Microthrix parvicella*

S: Standards für **Gesamtkeimzahl** bzw. ***Microthrix parvicella***

Der Analysenwert für eine Probe setzt sich jeweils aus zwei „MP“- und zwei „GKZ“-Messwerten zusammen (z.B. Probe 1: (MP1+MP1)/(GKZ1+GKZ1))

(3) Hybridisierung und Bindung an die Bindeplatte

Nehmen Sie die entsprechenden **Standards** (Gesamtkeimzahl und *M. parvicella*) aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie jeweils 10 µl des Standards **S1-GKZ** in Position A1, **S2-GKZ** in Position B1, **S1-MP** in Position A2 und **S2-MP** in Position B2.

Entnehmen Sie nun 10 µl des Überstands der lysierten Probe aus Schritt (2) und pipettieren Sie diese zu den 45 µl **Testlösung D-GKZ** der vorgesehenen Position. Entnehmen Sie weitere 10 µl der gleichen Probe und pipettieren Sie diese in **Testlösung D-MP** der entsprechenden Plattenposition (siehe

Pipettierschema für Einzelbestimmungen). Inkubieren Sie nun die Platte für 20 Minuten bei 50°C und 500 rpm.

Für Doppelbestimmungen folgen Sie bitte analog zu der oben beschriebenen Verfahrensweise dem Pipettierschema für Doppelbestimmungen.

Hinweis:

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

Vorbereitung weiterer Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro befüllte Mikrotiterplattenvertiefung (Proben und Standards) 100 µl Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen darin in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 12 befüllte Positionen benötigen Sie 1200 µl Waschlösung plus 12 µl Enzymlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10 % mehr zu.

Hinweise:

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

(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. Ist 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.

Hinweise:

Die verdünnte Enzymlösung muss für jeden Test frisch angesetzt werden und kann in dieser Form nicht über längere Zeit gelagert werden. Nehmen Sie die Enzymlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank.

(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 weiterer 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 schütteln. Bereits nach wenigen Minuten ist eine Blaufärbung sichtbar. Stoppen Sie durch Zugabe von je 50 µl **Stopplösung H** die Reaktion nach 3 min ab. Nach Zugabe der Stopplösung ist ein Farbumschlag nach gelb zu beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen kurz auf den Thermomixer. Achten Sie darauf, dass evtl. entstandene Luftblasen für die Auswertung mit dem Photometer vorher 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 in Microsoft Excel

Sie können nun über die Optionen **Drucken** die Ergebnisse ausdrucken und/oder über **Export** für die Verarbeitung in anderen Programmen wie Microsoft Excel exportieren.

Öffnen Sie dafür das Exceldatenblatt „Auswertung Microthrix“. Sie sehen mehrere Felder. In die grau unterlegte Fläche werden die Werte der Messung übertragen. Dafür öffnen Sie den Ordner "Messdata" im HybriScan®-Ordner und kopieren Sie die Messwerte in den dafür vorgesehenen, grauen Bereich. Sie erhalten nun sofort in den anderen Tabellen die berechneten Werte. Diese können Sie nun ausdrucken, oder in Ihr Datenblatt übertragen.

Hinweis: Das Exceldatenblatt für die Auswertung kann vom Internet unter www.sigma-aldrich.com/hybriscanwater heruntergeladen werden.

(9) Bewertung der Messergebnisse

Excel ermittelt mithilfe der Absorptionsmesswerte der Proben und mitgeführten Standards ein Analyseergebnis, das die relative Konzentration von *M. parvicella* im Verhältnis zum Microthrix-Standard bzw. zur Gesamtkeimzahl der untersuchten Proben angibt.

Die entsprechenden Standards müssen sich unbedingt in den angegebenen Vertiefungen befinden, da sonst eine falsche Auswertung erfolgt.

Kurzprotokoll

Bestimmung von *Microthrix parvicella* mit paralleler Gesamtkeimzahlbestimmung

1. Jeweils 100 µl Probe aus dem Probenbehälter entnehmen, zentrifugieren (max. Geschwindigkeit, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen und verwerfen
2. Pellet in 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren; 2 Spatelspitzen Glasbeads dazugeben; mischen und 15 min bei 37°C und 1.400 rpm im Thermoshaker schütteln
3. 450 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel) zugeben; 15 min bei 37°C inkubieren und bei 1.400 rpm im Thermoshaker schütteln
4. 10 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren
5. pro Standard und Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren (siehe Schema) und ca. 5 min bei 500 rpm auf 50°C im Thermoshaker vortemperieren
6. 10 µl Überstand aus Schritt 3 dazu pipettieren (Positionen A1, A2, B1 und B2 bei Einfachbestimmungen bzw. A1-A4 und B1 bis B4 bei Doppelbestimmungen sind für die entsprechenden Standards vorgesehen); Mikrotiterplatte abdecken und 20 min bei 50°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
7. Mikrotiterplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) spülen (2 min bei Raumtemperatur); Waschlösung anschließend entfernen
8. 100 µl verdünnte Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren und 10 min bei 500 rpm im Thermoshaker bei 25°C inkubieren
9. Mikrotiterplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und Waschschrift wiederholen
10. je Probe (inkl. Standards) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren; Mikrotiterplatte abdecken und ca. 3 min bei 25°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
11. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
12. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung mit dem Excel Datenblatt

Testdurchführung

Bestimmung von *Microthrix parvicella* ohne parallele Gesamtkeimzahlbestimmung

(1) Probennahme

Nehmen Sie für jede Probe ein 2ml-Reaktionsgefäß. Entnehmen Sie ihrem Probenbehälter ein Probevolumen von 100 µl und füllen dieses in das vorbereitete Reaktionsgefäß. Zentrifugieren Sie die Probe für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Durch den Zentrifugationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Bakterien sedimentiert. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium (Überstand). 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 Mikroorganismen von der Gefäßwand lösen. Zentrifugieren Sie ggf. ein zweites Mal.

(2) Zelllyse

Pipettieren Sie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe und geben Sie in jedes Gefäß zwei Spatelspitzen Glasbeads, mischen Sie die Reagenzien durch kurzes Schütteln. Stellen Sie danach die Proben für 15 min bei 1.400 rpm und 37°C in den vorgeheizten Thermomixer. Geben Sie anschließend 450 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 max. Geschwindigkeit.

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 50 µl einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

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 den Standard S1-MP 45 µl Testlösung D-MP in Vertiefung A1 der Mikrotiterplatte, für Standard S2-MP 45 µl Testlösung D-MP in Vertiefung B1 (siehe Pipettierschema für Einfachbestimmungen). Pipettieren Sie für jede Probe laut Pipettierschema für Einfachbestimmungen jeweils 45 µl Testlösung D-MP in eine der verbleibenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Zur Vermeidung von Fehlern (z.B. Volumenfehlern) empfiehlt es sich, eine Doppelbestimmung der Proben und der entsprechenden Standards vorzunehmen (siehe Pipettierschema für Doppelbestimmung). Stellen Sie danach 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 Messposition für die Standards und der „MP“-Wert jeder einzelnen Probe sehr wichtig, nur so lässt sich eine genaue Datenanalyse vornehmen.

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

Pipettierschema für Einfachbestimmungen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-MP											
B	S2-MP											
C	MP 1											
D	MP 2											
E	MP 3											
F	MP 4											
G	MP 5											
H	MP 6											

MP: *Microthrix parvicella*

S: Standards für *Microthrix parvicella*

Der Analysenwert für eine Probe setzt sich jeweils aus einem „MP“-Wert und den entsprechenden Standard-Messwerten zusammen.

Pipettierschema für Doppelbestimmungen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-MP	S1-MP										
B	S2-MP	S2-MP										
C	MP 1	MP 1										
D	MP 2	MP 2										
E	MP 3	MP 3										
F	MP 4	MP 4										
G	MP 5	MP 5										
H	MP 6	MP 6										

MP: *Microthrix parvicella*

S: Standards für *Microthrix parvicella*

Der Analysenwert für eine Probe setzt sich jeweils aus den Mittelwerten zweier „MP“-Werte und den Standard-Messwerten zusammen.

(3) Hybridisierung und Bindung an die Bindeplatte

Nehmen Sie die **Standards** (für die *M. parvicella*-Bestimmung) aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie jeweils 10 µl des Standards **S1-MP** in Position A1 und **S2-MP** in Position B1.

Entnehmen Sie nun 10 µl des Überstands der lysierten Probe aus Schritt (2) und pipettieren Sie diese zu den 45 µl **Testlösung D-MP** der vorgesehenen Position (siehe Pipettierschema). Inkubieren Sie nun die Platte für 20 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.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro befüllte Mikrotiterplattenvertiefung (Proben und Standards) 100 µl Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen darin in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 12 befüllte Positionen benötigen Sie 1200 µl Waschlösung plus 12 µl Enzymlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10 % mehr zu.

Hinweise:

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

(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. Ist 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.

Hinweise:

Die verdünnte Enzymlösung muss für jeden Test frisch angesetzt werden und kann in dieser Form nicht über längere Zeit gelagert werden. Nehmen Sie die Enzymlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank.

(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 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer. Entfernen Sie nachfolgend die Waschlösung und wiederholen Sie den Waschvorgang noch einmal.

Vorbereitung weiterer 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 schütteln. Stoppen Sie durch Zugabe von je 50 µl **Stopplösung H** die Reaktion nach 3 min ab. Nach Zugabe der Stopplösung ist ein Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen kurz auf den Thermomixer. Achten Sie darauf, dass evtl. entstandene Luftblasen für die Auswertung mit dem Photometer vorher 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 in Microsoft Excel

Sie können nun über die Optionen **Drucken** die Ergebnisse ausdrucken und/oder über **Export** für die Verarbeitung in anderen Programmen wie Microsoft Excel exportieren.

Öffnen Sie dafür das Exceldatenblatt „Auswertung Microthrix“. Sie sehen mehrere Felder. In die grau unterlegte Fläche werden die Werte der Messung übertragen. Dafür öffnen Sie den Ordner "Messdata" im HybriScan™ -Ordner und kopieren Sie die Messwerte in den dafür vorgesehenen, grauen Bereich. Sie erhalten nun sofort in den anderen Tabellen die berechneten Werte. Diese können Sie nun ausdrucken, oder in Ihr Datenblatt übertragen.

Hinweis: Das Exceldatenblatt für die Auswertung kann vom internet unter www.sigma-aldrich.com/hybriscanwater heruntergeladen werden.

(9) Bewertung der Messergebnisse

Excel ermittelt mithilfe der Absorptionsmesswerte der Proben und mitgeführten Standards ein Analyseergebnis, das die relative Konzentration von *M. parvicella* im Verhältnis zum Microthrix-Standard angibt.

Die entsprechenden Standards müssen sich unbedingt in den angegebenen Vertiefungen befinden, da sonst eine falsche Auswertung erfolgt.

Kurzprotokoll

Bestimmung von *Microthrix parvicella* ohne parallele Gesamtkeimzahlbestimmung

1. Jeweils 100 µl Probe aus dem Probenbehälter entnehmen, zentrifugieren (max. Geschwindigkeit, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen und verworfen
2. Pellet in 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren; 2 Spatelspitzen Glasbeads dazugeben; mischen und 15 min bei 37°C und 1.400 rpm im Thermoshaker schütteln
3. 450 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel) zugeben; 15 min bei 37°C inkubieren und bei 1.400 rpm im Thermoshaker schütteln
4. 10 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren
5. pro Standard und Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren (siehe Schema) und ca. 5 min bei 500 rpm auf 50°C im Thermoshaker vortemperieren
6. 10 µl Überstand aus Schritt 3 dazu pipettieren (Positionen A1 und B1 bei Einfachbestimmungen bzw. A1, A2, B1 und B2 bei Doppelbestimmungen sind für die entsprechenden Standards vorgesehen); Mikrotiterplatte abdecken und 20 min bei 50°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
7. Mikrotiterplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) spülen (2 min bei Raumtemperatur); Waschlösung anschließend entfernen
8. 100 µl verdünnte Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren und 10 min bei 500 rpm im Thermoshaker bei 25°C inkubieren
9. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und Waschschrift wiederholen
10. je Probe (inkl. Standards) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Bindeplatte pipettieren; Platte abdecken und ca. 3 min bei 25°C und 500 rpm im Thermoshaker inkubieren
11. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
12. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung mit dem Excel Datenblatt