

Milenia GenLine

Hopfenresistenzgen-Screen

Deutsch

Reagenzien zum Nachweis von Hopfenresistenzgenen

DE: Seite 1-12

Reagents for the detection of hop resistance genes

EN: Page 13-24

REF MGScHOR 1*  48

IFU / REF MGScHOR 1 / REV D / 2025-07-09

*** Bitte beachten:**

Dieser Kit enthält ausschließlich Reagenzien für die Amplifikation.
Zum **Nachweis** des Amplifikates benötigen Sie zusätzlich folgenden Kit:
Milenia GenLine PCR-Universalmodul REF MGUP 1 (50 Tests)

Hinweis: Signifikante Änderungen sind mit einer gepunkteten Linie am Rand gekennzeichnet. Eine Änderungshistorie befindet sich am Ende der Packungsbeilage.



Milenia Biotec GmbH

Versailler Str. 1

35394 Gießen

Deutschland

Tel.: +49 641 94 8883-0

Fax: +49 641 94 8883-80

E-Mail: info@milenia-biotec.de

Web: www.milenia-biotec.com

Inhaltsverzeichnis

Deutsch.....	1
Erklärung der Symbole.....	3
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	3
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität.....	4
Sicherheitsdatenblätter (SDB)	4
Erforderliche Materialien (nicht enthalten)	5
Zweckbestimmung	5
Methode und Testprinzip.....	5
Durchführung des Nachweises - ein kurzer Überblick.....	6
Vorbereitung der Proben und PCR-Reagenzien	6
a) Vorbereitung des Reaktionsmixes	6
b) Probenvorbereitung aus flüssigen Nährmedien	7
c) Probenvorbereitung von Einzelkolonien aus festen Medien.....	7
Testdurchführung.....	8
a) Amplifikationsreaktion.....	8
b) Nachweis der PCR-Produkte	8
Auswertung der Ergebnisse	9
a) Positiver Befund.....	9
b) Negativer Befund.....	9
c) Nicht auswertbar	10
Problemlösung.....	10
Referenzen	10
Zusätzlich verfügbare Produkte	11
Kontakt.....	11
Änderungshistorie	12

Erklärung der Symbole

Symbole	Erklärung	Symbole	Erklärung
	<i>Hersteller</i>		Ausreichend für <n> Prüfungen
	Verwendbar bis		<i>Gebrauchsanweisung</i> beachten oder elektronische <i>Gebrauchs-anweisung</i> beachten
	<i>Chargenbezeichnung</i>		Eindeutige Produktidentifizierung
	<i>Katalognummer</i>		Temperaturgrenzwerte

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Diese Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung aufmerksam lesen. Arbeitsschritte beachten.
- Die angegebenen Verfallsdaten aller Komponenten sind zu beachten.
- Vollständiges Auftauen der Komponenten vor der Benutzung ist erforderlich.
- Keine Kit-Komponenten verschiedener Chargen mischen.
- Die Reagenzien sind bei **-15 °C bis -25 °C** in den Originalverpackungen zu lagern.
- Die Komponenten **nach Gebrauch schnellstmöglich wieder bei -15 °C bis -25 °C lagern**.
- Die Abfallentsorgung muss gemäß den örtlichen Bestimmungen durchgeführt werden.
- Schutzkleidung wie Laborkittel und Einmalhandschuhe tragen.
- Eine räumliche Trennung zur Abarbeitung der verschiedenen Arbeitsschritte muss eingehalten werden, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Der Arbeitsplatz, an dem die Reaktionsmische hergestellt werden, sollte möglichst weit von dem Ort der Kultivierung und der PCR-Auswertung entfernt liegen.
- Regelmäßige Dekontamination von Arbeitsplatz und Geräten muss durchgeführt werden!

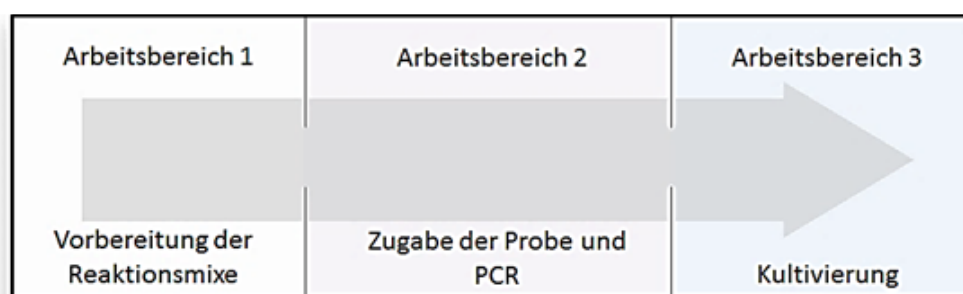


Abbildung 1: Aufteilung des Prüfverfahrens in verschiedene Arbeitsbereiche

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Kitbestandteile



REF	Inhalt	Art.-Nr.	Anzahl Tests
MGScHOR 1	2 x PCR-Polymerase-Master-Mix	MGPOL	48
	2 x PCR-Primer-Mix	MGPHOR	
	1 x Positive Kit-Kontrolle	MGLHPC	
	1 x PCR-Wasser *	MGH2O	

* Das PCR-Wasser (MGH2O) wird als Diluent und Negativkontrolle verwendet.

Lagerung und Stabilität

Kitkomponente	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
PCR-Polymerase Master-Mix (MGPOL)	300 µl	gebrauchsfertig	-15 °C bis -25 °C	Bis zum Verfallsdatum
PCR-Primer-Mix (MGPHOR)	280 µl	gebrauchsfertig	-15 °C bis -25 °C	Bis zum Verfallsdatum
Positive Kit-Kontrolle (MGLHPC)	250 µl	gebrauchsfertig	-15 °C bis -25 °C	Bis zum Verfallsdatum
PCR-Wasser (MGH2O)	1000 µl	gebrauchsfertig	-15 °C bis -25 °C	Bis zum Verfallsdatum

Sicherheitsdatenblätter (SDB)

Sicherheitsdatenblätter (SDB) sind auf Anfrage und alternativ unter dem jeweiligen Produkt auf unserer Webseite zu finden (www.milenia-biotec.com).

[SDB REF MGScHOR 1 - Hop Resistance Gene-Screen](#)

Erforderliche Materialien (nicht enthalten)

Zusätzlich zu den Reagenzien dieses Kits werden folgende Reagenzien und Hilfsmittel benötigt:

- **Milenia GenLine PCR-Universalmodul (MGUP 1)**, enthält Teststreifen und Laufpuffer
- **Thermocycler Labcycler 48s (MLCY)**, zu beziehen über Milenia Biotec GmbH
- Gefrierschrank: -20 °C
- Pipetten 2- 20 µl, 20- 200 µl, 100- 1000 µl
- Sterile (DNA-freie) Pipettenspitzen (mit Kontaminationsschutz für PCR)
- Sterile (DNA-freie) Reaktionsgefäße 1,5 ml
- Sterile (DNA-freie) PCR-Gefäße 0,2 ml; empfohlen: Reaktionsgefäße der Fa. Sorensen Bioscience Inc. aufgrund dünner Wandstärke für optimalen Temperaturübergang
- 96-Well-Mikrotiterplatte
- (Tisch-) Zentrifuge für Reaktionsgefäße
- Vortexer
- Magnetrührer
- Ständer für Reaktionsgefäße z.B.: IsoFreeze PCR-Racks

Zweckbestimmung

Der Milenia GenLine Hopfenresistenzgen-Screen wurde zum qualitativen Nachweis von Hopfenresistenzgenen entwickelt.

Methode und Testprinzip

Der Milenia GenLine Hopfenresistenzgen-Screen ist ein Schnellnachweissystem auf Basis von PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Der Screening-Test wird mit dem Evaluationskit MGUP 1 kombiniert, das dem Anwender eine optische Auswertung der PCR-Reaktion über Lateral-Flow-Teststreifen ermöglicht.

Im ersten Teil des Nachweises werden mit Hilfe definierter, speziell markierter Primer (kurze, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide) DNA-Fragmente des Hopfenresistenzgens amplifiziert. Diese Markierungen werden in die entstehenden PCR-Produkte eingebaut. Sofern die bakterienspezifische DNA in der Probe vorhanden ist, wird diese amplifiziert. Zusätzlich wird ein internes Kontrollfragment amplifiziert. Dieses interne Kontrollfragment gibt Aufschluss über die Funktionalität der Amplifikationsreaktion.

Die entstandenen PCR-Fragmente können im zweiten Teil des Nachweises durch einen Teststreifen sichtbar gemacht werden. Aufgrund der Markierungen werden entstandene PCR-Fragmente an definierten Positionen des Teststreifens festgehalten und über mobile Gold-markierte Antikörper gebunden. So bildet sich ein „molekulares Sandwich“ aus, das binnen weniger Minuten auf dem Teststreifen sichtbar gemacht werden kann.

Durchführung des Nachweises - ein kurzer Überblick

Die komplette Durchführung des Tests gliedert sich in 3 Teilabschnitte:

1. Vorbereitung der PCR-Reagenzien und des Probenmaterials
2. Durchführung der PCR
3. Auswertung mittels Lateral Flow System



Abbildung 2: Durchführung des Nachweises

Vorbereitung der Proben und PCR-Reagenzien

Die Vorbereitung der Proben und Reagenzien umfasst die Herstellung eines PCR-Reaktionsmix, sowie erforderliche Vorbereitungen der zu analysierenden Probenmatrix.

a) Vorbereitung des Reaktionsmixes

Das exakte und kontaminationsfreie Vorbereiten des Reaktionsmixes ist entscheidend für die Funktionalität der Nachweise. Das sofortige Beschriften der Reaktionsgefäße wird empfohlen. Der fertig aliquotierte Reaktionsmix sollte unmittelbar verwendet und während der Probenzugabe kühl (z.B. auf Eis) gelagert werden. Falls eine positive (MGLHPC) und eine negative (MGH2O) Kontrolle mitgeführt werden, müssen zwei Reaktionen zusätzlich berechnet werden.

Durchführung:

1. Entsprechend der geplanten Tests (sowie einer positiven und einer negativen Kontrolle) **PCR-Polymerase Master Mix** in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegen (siehe Tabelle 1).
2. Ein entsprechendes Volumen an **PCR-Primer-Mix** zugegeben (siehe Tabelle 1).
3. Den Mix aus beiden Lösungen **gut mischen** (Pipette, Vortex).
4. Je nach Anzahl geplanter Reaktionen **sterile 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße** vorbereiten.
5. In jedes PCR-Reaktionsgefäß **23 µl** aus dem hergestellten **Reaktionsmix** pipettieren.
6. Die PCR-Reaktionsgefäße **sofort verschließen**.
An einem separaten Arbeitsplatz erfolgt die Zugabe der Probe.

Tabelle 1: Übersicht über die zu pipettierenden Volumina des PCR-Master-Mix und des Primer-Mix in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Reaktionen.

Anzahl der PCR-Reaktionen	Pipettiervolumen PCR-Polymerase Master-Mix	Pipettiervolumen PCR-Primermix
1	13 µl	11 µl
5	65 µl	55 µl
10	130 µl	110 µl
20	260 µl	220 µl

b) Probenvorbereitung aus flüssigen Nährmedien

Für die Analyse aus Flüssiganreicherungen ist keine Probenvorbereitung erforderlich. Dabei können die gängigsten Medien auf MRS-Basis verwendet werden.

<u>Medium:</u>	NBB-B (Bouillon)	– Döhler GmbH (Darmstadt)
	NBB-B-AM (Bouillon)	– Döhler GmbH (Darmstadt)
	NBB-C (Konzentrat)	– Döhler GmbH (Darmstadt)

Aus der jeweiligen Anreicherung werden 2 µl direkt in den vorbereiteten Reaktionsmix gegeben.

Hinweis:

Stark trübe Anreicherungen beinhalten sehr viel biologisches Material. Das kann die Reaktion stören oder komplett inhibieren. Deshalb empfiehlt sich hierbei eine Vorverdünnung (z.B. 1:10 / 1:100) der Probe.

c) Probenvorbereitung von Einzelkolonien aus festen Medien

Durchführung:

1. Die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig berühren (nicht wischen).
2. Anschließend wird das Zellmaterial in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert.
3. Aus dieser Zellsuspension werden 2 µl als Probe zum vorbereiteten PCR-Mix gegeben.

Hinweis:

Zu viel Zellmaterial kann die Reaktion negativ beeinflussen. Vorsichtiges Berühren der Kolonie in Schritt 1 ist ausreichend.

Testdurchführung

Die Testdurchführung beschreibt das Starten und Beenden der PCR sowie den anschließenden Nachweis der PCR-Produkte über den Teststreifen (Milenia GenLine Universalmodul MGUP 1).

a) Amplifikationsreaktion

1. Nach Zugabe der zu analysierenden Probe die PCR-Gefäße mit den Reaktionsansätzen fest verschließen und gut mischen.
2. Die PCR-Gefäße in die Tischzentrifuge stellen und kurz an zentrifugieren.
3. Die Flüssigkeit sollte luftblasenfrei am Boden der Gefäße zu finden sein.
4. Die Reaktionsansätze in den Thermocycler stellen.
5. Den Deckel des Thermocyclers verschließen.
6. Das spezifische "HOR-Screen" Programm im Ordner „Bier“ starten.
7. Nach Ablauf des Temperaturprotokolls muss das Programm gestoppt werden und die Reaktionsgefäße aus dem Thermocycler entnommen werden.

Nach Ablauf der Zyklen pausiert der Thermocycler bei 8 °C. Die PCR-Produkte sind im Kühlschrank (ca. 4 °C) zu lagern und schnellstmöglich (max. 24 h nach PCR) zu analysieren.

b) Nachweis der PCR-Produkte

Zum Nachweis des Amplifikates wird das **Milenia GenLine PCR-Universalmodul MGUP 1** benötigt.

Es wird die Verwendung von Pipettenspitzen mit Filter bzw. eine separate Pipette für die Zugabe der zu analysierenden Probe und die Auswertung der PCR-Produkte empfohlen, um das DNA-Kontaminationsrisiko zu minimieren. Außerdem sind eine regelmäßige Dekontamination der Pipetten und eine räumliche Trennung von Probenzugabe und Auswertung der PCR ratsam.

Durchführung:

1. Legen Sie entsprechend der Anzahl an durchzuführenden Analysen, je 80 µl Laufpuffer (MGCBA) in ein sauberes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte vor.
2. Beschriften Sie für jede Analyse einen Teststreifen (MGDS2A) und legen Sie ihn bereit.
3. Pipettieren Sie 2 µl des Amplifikates aus dem jeweiligen 0,2 ml PCR-Gefäß auf die Auftragsfläche eines Teststreifens. Das Berühren der Auftragsfläche ist hierbei möglich.



4. Stellen Sie den Streifen senkrecht in den vorgelegten Laufpuffer. Die Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur ist zu beachten. Lesen Sie das Ergebnis nach genau 5 Minuten Laufzeit visuell ab.
5. Zur Dokumentation wird eine Fotoaufnahme empfohlen.

Hinweis:

Die Inkubationszeit von 5 Minuten darf nicht überschritten werden. Unspezifische Signale in Form von schwachen Signalen können nach mehr als 5 Minuten Inkubationszeit auftreten.

Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Teststreifen erfolgt visuell. Alle Varianten an Ergebnissen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

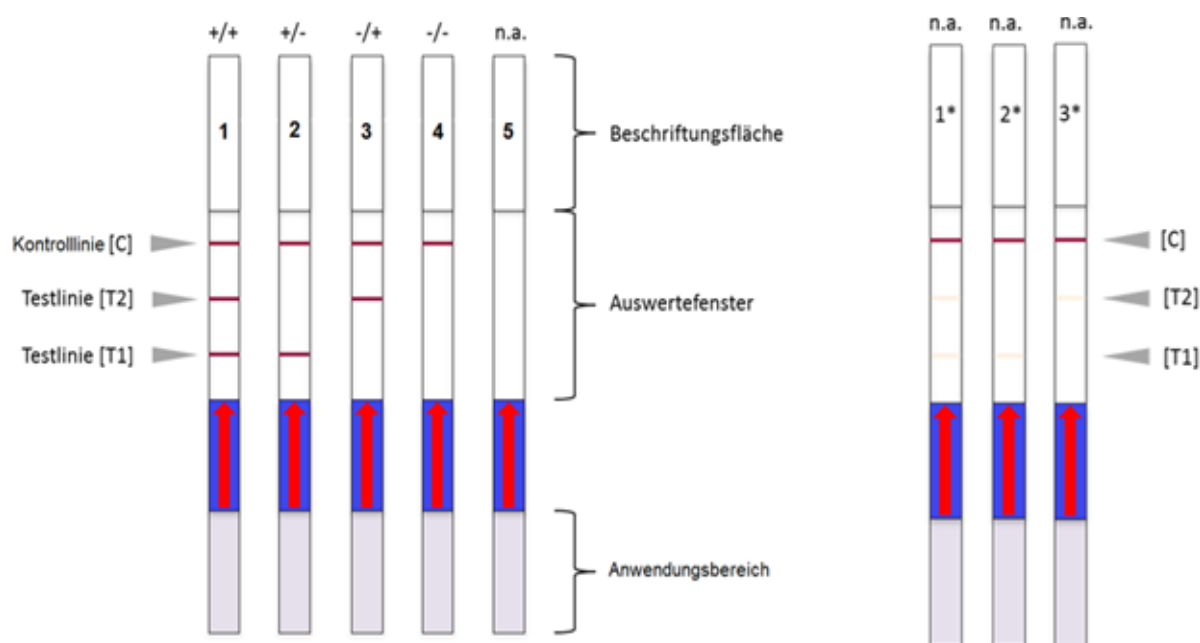


Abbildung 3: Mögliche Varianten an Ergebnissen zur visuellen Auswertung der Teststreifen.

Die Funktionskontrolle [C-Linie] bestätigt die Funktionalität des Teststreifens. Die Amplifikationskontrolle [T2-Linie] gibt Aufschluss über die Funktionalität der PCR. Die Testlinie [T1-Linie] zeigt an, ob der Zielorganismus in der Probe vorhanden ist.

a) Positiver Befund

Voraussetzung für einen validen positiven Befund ist das Erscheinen einer deutlich erkennbaren Testlinie [T1] (Teststreifen **1 und 2**). Wenn hohe Konzentrationen des Zielgens in den Test eingebracht werden, kann die Amplifikationskontrolle [T2] verschwinden. Trotzdem wird es auf der Testlinie [T1] ein starkes Signal geben. In diesem Fall ist der Test als positiv zu bewerten (Teststreifen **2**).

b) Negativer Befund

Ein valider negativer Befund erfordert eine deutlich erkennbare PCR-Kontrolle [T2]. Die Testlinie [T1] ist nicht erkennbar (Teststreifen **3**).

Hinweis: Bei einer sehr schwach positiven PCR-Kontrolle [T2] ist eine Inhibition der PCR sehr wahrscheinlich (Teststreifen **3***). In diesem Fall sollte ein Wiederholungslauf mit verdünntem Probenmaterial durchgeführt werden.

c) Nicht auswertbar

Sind weder Testlinie [T1] noch PCR-Kontrolle [T2] erkennbar, ist der Nachweis nicht auswertbar (Teststreifen **4**). Erscheint nur die Kontrolllinie [C], wurde die PCR-Probe nicht korrekt aufgetragen oder die Amplifikationsreaktion hat nicht funktioniert.

Bleiben alle Linien auf dem Teststreifen aus (Teststreifen **5**), kontaktieren Sie bitte den Kundenservice der Milenia Biotec GmbH.

Problemlösung

Die negative Kontrolle liefert einen positiven Befund.

Kontaminationen sind eine große Gefahr bei der Arbeit mit Nukleinsäuren. Folgende Schutzmaßnahmen werden empfohlen:

- Überprüfen des verwendeten PCR-Protokolls im Thermocycler auf Richtigkeit
- Dekontaminieren des Arbeitsbereiches, an dem der Reaktionsmix hergestellt wird
- Gründliches Dekontaminieren der Pipetten
- Verwendung von ungeöffneten, sterilen Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, 1,5 ml Reaktionsgefäße, PCR-Gefäße)

Um die Effektivität der eingeleiteten Maßnahmen zu überprüfen, sollte nach der Dekontamination ein Kontrolllauf durchgeführt werden. Hierfür empfiehlt es sich, eine Positiv- und eine Negativkontrolle zu verwenden. Die Negativkontrolle **muss** negativ sein.

Liefert die Negativkontrolle ein positives Signal, sind die Reagenzien möglicherweise kontaminiert. Es müssen neue Nachweis-Reagenzien (PCR-Wasser, PCR-Polymerase Master-Mix (2x) und PCR-Primer-Mix (2x) verwendet werden). Im anschließenden Kontrolllauf **muss** die negative Kontrolle (PCR-Wasser, MGH2O) negativ sein.

Ist die negative Kontrolle erneut positiv, kontaktieren Sie den Kundenservice der Milenia Biotec GmbH.

Referenzen

1. Koob, J et al., Molekularbiologischer Nachweis bierschädigender Organismen, Der Weihenstephaner, October 2015
2. Koob, J: „A New Approach to Bacterial Identification in a Point-of-Care Format“; European Brewery Convention. Mundiconvenius, Porto, Portugal (2015)

Zusätzlich verfügbare Produkte

REF	Produktname	Testanzahl	Beschreibung
MGUP 1	PCR Universal-Modul	50 Tests	Lateral-Flow-Teststreifen zum Nachweis von genomischen Amplifikaten (Bierkeimen).
MGScLP 1	Lactobacillus/ Pediococcus-Screen	48 Tests	Reagenzien zum Nachweis von bierschädigenden <i>Lactobacillus</i> sp. und <i>Pediococcus</i> sp.
MGScMP 1	Megasphaera/ Pectinatus-Screen	48 Tests	Reagenzien zum Nachweis von bierschädigenden <i>Megasphaera</i> sp. und <i>Pectinatus</i> sp.
MGES 1	Extraktionssystem	1000 Reaktionen	Universelles Kit zur Isolierung von Analyten aus Abstrichproben für die Weiterverarbeitung.
MGSDb	Extraktionspuffer	100 Reaktionen	Puffer zur Aufreinigung von Abstrichproben mit MGES 1.

Kontakt

Für Rückfragen und weitere Informationen setzen Sie sich jederzeit gerne mit uns in Verbindung:

**Milenia Biotec GmbH**

Versailler Str. 1

35394 Gießen

Deutschland

Tel.: +49 641 94 8883-0

Fax: +49 641 94 8883-80

E-Mail: info@milenia-biotec.de

Web: www.milenia-biotec.com

Änderungshistorie

Datum	Revision	Revisionsgrund
01.03.2017	MGSCHOR 1/ B /2017-03-01	Einfügen der englischen Beschreibung
19.06.2019	MGSCHOR 1/ C /2019-06-19	Anpassung der Menge MGUP 1
09.07.2025	IFU/ REF MGSCHOR 1 / REV D / 2025-07-09	IFU in neuem Design erstellt und überarbeitet in folgenden Kapiteln: • Erklärung der Symbole (UDI-Symbol und Symbol Temperaturgrenzwerte hinzugefügt) • Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität • Sicherheitsdatenblätter (Kapitel neu erstellt) • Methode und Testprinzip • Testdurchführung (Hinweis hinzugefügt) • Zusätzlich verfügbare Produkte

Milenia GenLine

Hop Resistance Gene-Screen

English

Reagenzien zum Nachweis von Hopfenresistenzgenen

DE: Seite 1-12

Reagents for the detection of hop resistance genes

EN: Page 13-24

REF MGScHOR 1*  48

IFU / REF MGScHOR 1 / REV D / 2025-07-09

*** Attention:**

This kit contains only reagents used for amplification.

For the **detection** of amplicates the following additional kit is required:

Milenia GenLine PCR-Universal module REF MGUP 1 (50 tests)

Note: Significant changes are indicated by dotted lines in the margin.

A change history can be found at the end of the manual.



Milenia Biotec GmbH

Versailler Str. 1

35394 Gießen

Germany

Tel.: +49 641 94 8883-0

Fax: +49 641 94 8883-80

E-mail: info@milenia-biotec.de

Web: www.milenia-biotec.com

Table of Contents

English	13
Explanation of Symbols	15
Warnings and Precautions.....	15
Materials Supplied, Storage and Stability.....	16
Safety Data Sheets (SDS)	16
Materials Required but not Supplied	17
Intended Use	17
Method and Test Principle.....	17
Procedure of the Test – A short Overview.....	18
Preparation of Samples and PCR Reagents.....	18
a) Preparation of PCR Reaction Mix.....	18
b) Sample preparation from liquid culture media	19
c) Sample preparation of single colonies from solid media	19
Test Procedure.....	20
a) PCR Reaction.....	20
b) Detection of PCR Products	20
Interpretation of Results.....	21
a) Positive Result	21
b) Negative Result	21
c) No Analysis Possible	22
Troubleshooting	22
References	22
Additional Products Available.....	23
Contact.....	23
Change History	24

Explanation of Symbols

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	<i>Manufacturer</i>		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Consult <i>instructions for use</i> or consult electronic <i>instructions for use</i>
	<i>Batch code</i>		Unique device identifier
	<i>Catalogue number</i>		Temperature limit

Warnings and Precautions

- Read this instruction for use carefully prior running the test. Follow the sequence of the work steps.
- Pay attention to the expiration dates of the individual components of the test.
- Complete thawing of all components prior use is required.
- Do not exchange components with different Lot numbers.
- Store all reagents at **-15 °C to -25 °C** in the original packaging.
- **Immediately after use**, store all components at **-15 °C to -25 °C**.
- The disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations.
- Wear laboratory coat and protective gloves.
- In order to avoid contaminations, run the different steps of the test at different locations.
- The place where the reaction mixes are prepared must be separated from the place where cultures are handled and where the evaluation of PCR is done.
- Decontamination of the work area and the equipment used must be carried out regularly!

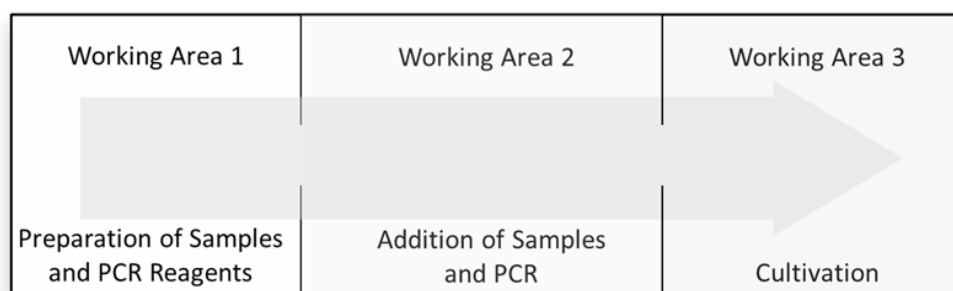


Figure 1: Separation of the testing procedure in different working areas

Materials Supplied, Storage and Stability

Materials Supplied



REF	Content	Part.-No.	No. of Tests
MGScHOR 1	2 x PCR-Polymerase Master Mix	MGPOL	48
	2 x PCR-Primer Mix	MGPHOR	
	1 x Positive Kit-Control	MGLHPC	
	1 x PCR-Water *	MGH2O	

* The PCR-Water (MGH2O) is used as diluent and negative control.

Storage and Stability

Kit Component	Content	Preparation	Storage	Shelf Life
PCR-Polymerase Master Mix (MGPOL)	300 µL	ready-to-use	-15 °C bis -25 °C	until expiry date
PCR-Primer Mix (MGPHOR)	280 µL	ready-to-use	-15 °C bis -25 °C	until expiry date
Positive Kit Control (MGLHPC)	250 µL	ready-to-use	-15 °C bis -25 °C	until expiry date
PCR-Water (MGH2O)	1000 µL	ready-to-use	-15 °C bis -25 °C	until expiry date

Safety Data Sheets (SDS)

Safety Data Sheets (SDS) are available on request and alternatively under the respective product on our website (www.milenia-biotech.com).

[SDS REF MGScHOR 1 - Hop Resistance Gene-Screen](#)

Materials Required but not Supplied

In addition to the components supplied with the kit, the following reagents and items are required:

- **Milenia GenLine PCR-Universal module (MGUP 1)**. Contains test strips and chase buffer.
- **Thermocycler Labcycler 48s, (MLCY)**, available at Milenia Biotec GmbH
- Deep Freezer: -20 °C
- Pipets 2- 20 µL, 20- 200 µL, 100- 1,000 µL
- Sterile (DNA-free) pipet tips (with contamination protection for PCR)
- Sterile (DNA-free) reaction tubes 1.5 mL
- Sterile (DNA-free) PCR-tubes 0.2 mL; recommended: Reaction vessels from Sorensen Bioscience Inc. due to thin wall thickness for optimum temperature transfer
- 96-well microtiter plate
- (Desktop) centrifuge for reaction- and PCR-tubes
- Vortex mixer
- Tube holder for reaction- and PCR-tubes, e.g.: isofreeze PCR tube rack

Intended Use

The Milenia GenLine Hop resistance gene-Screen is designed for the qualitative detection of hop resistance genes of spoiling organisms.

Method and Test Principle

Milenia GenLine Hop resistance gene-Screen is a rapid detection system based on PCR (polymerase-chain-reaction). The screening test is combined with the evaluation kit MGUP 1 which allows the user a optical evaluation of the PCR reaction via lateral flow test strips.

In a first part of the test, labelled specific primers (short, single stranded DNAs) are used to amplify specific DNA fragments of the hop resistance gene. Thus, the resulting PCR products carry the labels of the incorporated primers. In addition to the target gene, a control gene, which is also present in the PCR mixes, is amplified to make sure that the PCR process works properly.

In a second part of the test, the created PCR products are detected by a lateral flow test strip. The PCR products bind via their labels to antibodies attached to the solid phase of the strip and to colloidal gold particles which are coated with an antibody directed against the other label. Thus a "molecular sandwich" is formed and becomes visible as a line on the test strip.

Procedure of the Test – A short Overview

The entire procedure of the test can be divided into 3 different steps.

1. Preparation of PCR reagents and sample
2. PCR reaction
3. Evaluation by a simple lateral flow test strip



Figure 2: Presentation of how the procedure is carried out

Preparation of Samples and PCR Reagents

The preparation of samples and reagents includes the preparation of the PCR reaction mix and the samples to be analysed.

a) Preparation of PCR Reaction Mix

The precise and contamination free preparation of the mix is the prerequisite of a proper function of the test. It is recommended to label all reaction tubes prior pipetting the samples. In case a positive (MGLHPC) and a negative (MGH2O) control is included in the run, add 2 additional tubes to the number of samples introduced in the test run.

Procedure:

1. According to the number of samples (plus positive and negative control) pipette **PCR Polymerase Master Mix** into a sterile 1.5 mL reaction tube (see Table 1).
2. Add an appropriate volume of **PCR Primer Mix** (see Table 1).
3. **Mix** the two solutions (reaction mix) **well** (pipet, Vortex).
4. Prepare **sterile 0.2 mL PCR reaction tubes** according to the number of planned reactions.
5. Pipet **23 µL** of the prepared reaction mix into each PCR reaction tube.
6. **Immediately close** the PCR-reaction tubes.
The sample is added at a separate workstation.

Table 1: Overview over the volumes to be pipetted depending on the number of PCR reaction tubes.

Number of PCR Reaction Tubes	Pipette volume PCR Polymerase Master Mix	Pipette volume PCR Primer Mix
1	13 µL	11 µL
5	65 µL	55 µL
10	130 µL	110 µL
20	260 µL	220 µL

b) Sample preparation from liquid culture media

No sample preparation is needed if the analysis is done from liquid culture media.

The following media based on MRS can be used for the test:

<u>Medium:</u>	NBB-B (Bouillon)	– Döhler GmbH (Darmstadt)
	NBB-B-AM (Bouillon)	– Döhler GmbH (Darmstadt)
	NBB-C (Concentrate)	– Döhler GmbH (Darmstadt)

2 µL from the enriched culture are transferred to the prepared PCR reaction mix.

Note:

Very turbid enriched cultures contain large amounts of biological material. This can have a negative impact on the test or even may inhibit it completely. Therefore, such samples must be pre-diluted 1:10 or 1:100 prior testing.

c) Sample preparation of single colonies from solid media

Procedure:

1. Touch a colony on the agar plate with a pipet tip. Do not wipe across the colony.
2. Resuspend the cells in 100 µL sterile water.
3. Add 2 µL of the cell suspension to the PCR reaction mix.

Note:

If too many cells are added to the mix, this may have a negative impact on the test. Therefore, a careful light touch in step 1 is recommended.

Test Procedure

The test procedure describes the start and termination of the PCR reaction as well as the subsequent lateral flow based detection of PCR products by a universal Test Strip (Milenia GenLine PCR Universal Module MGUP 1).

a) PCR Reaction

1. After addition of the sample to the PCR tube containing the reaction mix, close the tube and mix well.
2. Place all PCR tubes into a minicentrifuge and centrifuge the samples briefly.
3. All liquid should be free of air bubbles and located on the bottom of the PCR tubes.
4. Place all PCR tubes into a thermocycler.
5. Close the lid of the thermocycler.
6. Start the species-specific program "HOR-Screen" within the folder „Bier“.
7. After completion of the program, stop the program and remove the PCR tubes from the thermocycler.

When the program is finished, the thermocycler holds a temperature of 8 °C. PCR products must be stored in a refrigerator (app. 4 °C) and should be analyzed subsequently (max. 24 h later).

b) Detection of PCR Products

For the detection of PCR products, the **Milenia GenLine PCR-Universal Module REF MGUP 1** is required.

It is strongly recommended to use pipet tips with filter and separate pipets for the addition of the sample to be analyzed and the evaluation of PCR products to minimize the risk of DNA contamination. Regular decontamination of the pipettes and the separation of the different working steps at different locations are recommended.

Procedure:

1. According to the number of tests, pipet 80 µL chase buffer (MGCBA) each into clean wells of a 96-well microtiter plate.
2. Label each test strip (MGDS2A) needed for the analysis and take it aside.
3. Pipet 2 µL of each PCR product onto the sample application pad of a test strip.



4. Place the test strip with the sample application pad down into the chase buffer of the wells of the microtiter plate and incubate for 5 min at room temperature. Read the results visually after exactly 5 min.
5. A documentation by taking an image of the strips with a camera is recommended.

Hinweis:

Results must be read exactly after 5 minutes! After prolonged time unspecific, weak signals may occur on the test strip which are not associated with positive results.

Interpretation of Results

Tests are interpreted visually. Potential test results are shown in the figure below.

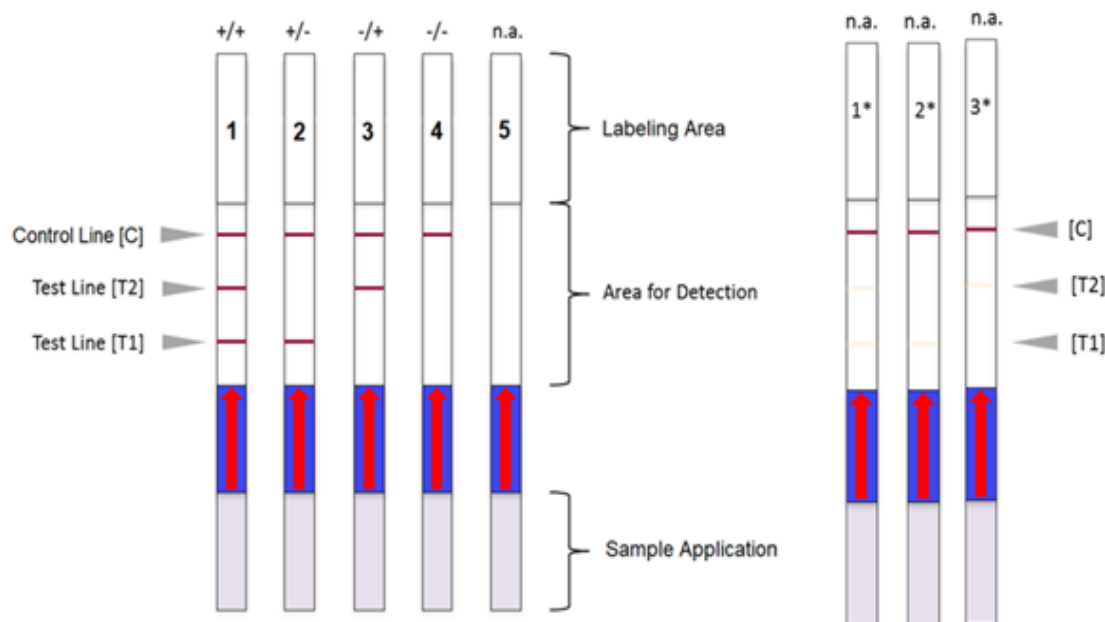


Figure 3: Potential test results for visual interpretation

The control line [C] confirms the proper function of the test strip. The test line 1 [T1] is associated with the presence or absence of the target gene. The test line 2 [T2] is linked with the proper function of the PCR.

a) Positive Result

The prerequisite for a valid positive result is the appearance of a distinct test line [T1] (test strip **1 and 2**). If high levels of the target gene are introduced into the test, the amplification control can vanish. Nevertheless, there will be a strong signal on test line T1. Therefore, no line may be visible at the test line [T2]. Such results should be read positive (test strip **2**).

b) Negative Result

A valid negative result requires a distinct visible test line [T2]. This confirms that the PCR has worked properly. The test line [T1] is not visible (test strip **3**).

Note:

If the line of the PCR control [T2] is weakly visible, an inhibition of the PCR is very likely (test strip **3***). In this case it is recommended to rerun the samples after predilution.

c) No Analysis Possible

If neither the test line [T1] nor the PCR control [T2] is visible, no result can be reported (test strip **4**). In case only the line at the location of the control line [C] is visible, either the PCR product has not been transferred successfully to the strip or the amplification control has not performed properly.

If **no line** is visible on the test strip (test strip **5**), please contact the customer service at Milenia Biotec GmbH.

Troubleshooting

The negative control gives a positive result.

Contaminations are a high risk when working with nucleic acids. It is very difficult to find out the reasons for contamination of materials of cellular origin or of purified DNA. Therefore, the following preventive actions are strongly recommended:

- Check that the chosen PCR protocol of the thermocycler was correct.
- Decontaminate the workspace where the preparation of the reaction mix is done.
- Decontaminate the pipets.
- Use unopened, sterile plastic materials (pipet tips/ 1.5 mL reaction vials/PCR vials).

After decontamination, a test run should be performed in order to check the effectiveness of the preventive actions. It is recommended to run a positive and a negative control. The negative control **must** show a negative result.

If the negative control shows a positive result, this may be due to contamination of the reagents. In this case new reagents (PCR-Water, PCR-Polymerase master mix (2x) and PCR-Primer mix (2x) must be used. In the subsequent control run the negative control (PCR-Water, MGH2O) must be negative.

If the negative result shows a positive result again, please contact customer service at Milenia Biotec GmbH.

References

1. Koob, J et al., Molekularbiologischer Nachweis bierschädigender Organismen, Der Weihenstephaner, October 2015
2. Koob, J: „A New Approach to Bacterial Identification in a Point-of-Care Format“; European Brewery Convention. Mundiconvenius, Porto, Portugal (2015)

Additional Products Available

REF	Produktname	Testanzahl	Beschreibung
MGUP 1	PCR Universal Module	50 tests	Lateral flow dipsticks for the detection of Genomic Amplificates (beer germs).
MGScLP 1	Lactobacillus/ Pediococcus-Screen	48 tests	Reagents for the detection of beer spoiling <i>Lactobacillus sp.</i> and <i>Pediococcus sp.</i> .
MGScMP 1	Megasphaera/ Pectinatus-Screen	48 tests	Reagents for the detection of beer spoiling <i>Megasphaera sp.</i> and <i>Pectinatus sp.</i> .
MGES 1	Extraction System	1000 reactions	Universal kit for the isolation of analytes from swabs for further processing.
MGSDb	Extraction Buffer	100 reactions	Buffer for purification of swab samples with MGES 1.

Contact

For additional information and support, please contact us:

**Milenia Biotec GmbH**

Versailler Str. 1

35394 Gießen

Germany

Tel.: +49 641 94 8883-0

Fax: +49 641 94 8883-80

E-mail: info@milenia-biotec.de

Web: www.milenia-biotec.com

Change History

Date	Revision	Cause of Revision
2017-03-01	MGScHOR 1/ B /2017-03-01	Insertion of english description
2019-06-19	MGScHOR 1/ C /2019-06-19	Adjustment of the MGUP 1 quantity
2025-07-09	IFU/REF MGScHOR 1/REV D / 2025-07-09	IFU created in a new design and revised in the following chapters: - Explanation of Symbols (UDI symbol and symbol Temperature limit added) - Materials Supplied, Storage and Stability - Safety Data Sheets (new chapter created) - Method and Test Principle - Test Procedure (note added) - Additional Products available

