

HybriScan[®] D Hefe

**Molekularbiologisches Schnelltestsyste
zum Nachweis von Hefen in alkoholfreien
Getränken**

Produkt-Nr.: 61397



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. – Nr.:	61397
Anzahl der Tests:	96 Bestimmungen, inkl. 6 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 Hefe können u.a. Hefen der Gattungen <i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , <i>Torulasporea</i> , <i>Pichia</i> und <i>Candida</i> nachgewiesen werden.

HybriScan^{®D} Hefe-Testdurchführung

Testprinzip

HybriScan^{®D} Hefe ist ein molekularbiologisches Schnelltestverfahren zum Nachweis getränkeschädlicher Hefen in filtrierbaren Säften und anderen alkoholfreien Getränken. HybriScan^{®D} Hefe 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 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 sind die Flaschen wieder zu verschließen. Dabei darauf achten, dass die Verschlüsse nicht verwechselt werden. Die 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 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 Klebstreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung aufbewahrt werden.	1 Stk
3. Standards 1 – 4 ^{a)} (weiße Schraubdeckel); Nullwert sowie verschiedene Konzentrationen synthetisch hergestellter RNA als Positivkontrolle sowie zur Erstellung einer Eichkurve für quantitative Bestimmungen, gebrauchsfertig	je 0,2 ml
4. Lysisreagenz A (roter Deckel), gebrauchsfertig	1,0 ml
5. Lysispuffer B ^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	8,0 ml
6. Testlösung D (gelber Deckel), gebrauchsfertig	5,0 ml
7. Waschlösung E ^{b)} (blauer Deckel), gebrauchsfertig	90 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 ml
10. Stopplösung H (grüner Deckel) 0,50 mol/l Schwefelsäure, gebrauchsfertig	5 ml
11. 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

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

Spezifität

U.a. können folgende Arten getränkeschädlicher Hefen mit dem HybriScan[®]D Hefe – Kit nachgewiesen werden :

Gattung <i>Saccharomyces</i> :	<i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces kluyveri</i>
Gattung <i>Zygosaccharomyces</i> :	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Zygosaccharomyces bisporus</i> <i>Zygosaccharomyces florentinus</i> <i>Zygosaccharomyces lentus</i> <i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Gattung <i>Pichia</i> :	<i>Pichia anomala</i> <i>Pichia fermentas</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pichia membranefaciens</i>
Gattung <i>Candida</i> :	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i>) <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida stellata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida versatilis</i>
Gattung <i>Torulasporea</i> :	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
Gattung <i>Brettanomyces</i> :	<i>Brettanomyces anomala</i> <i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Gattung <i>Debaryomyces</i> :	<i>Debaryomyces castellii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>
Gattung <i>Hanseniaspora</i> :	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora occidentalis</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>

Testdurchführung

(1) Vorkultivierung (optional)

Filtern Sie 100 – 1000 ml Probe durch einen 0,45 µm Filter. Inkubieren Sie den Filter in einem mit 5 ml Anreicherungsmedium gefüllten Kulturröhrchen (z.B. SSL-Broth, 26°C, 18 – 24 h). Die Wahl des Anreicherungsmediums, die Anreicherungstemperatur und die Dauer der Vorkultivierung richtet sich nach den nachzuweisenden Hefearten.

(2) Probenahme

Nehmen Sie für jede Probe ein 2 ml-Reaktionsgefäß und geben Sie in jedes Gefäß eine Spatelspitze Glasbeads. Entnehmen Sie aus ihrer vorkultivierten Probe ein Volumen von 2 ml und füllen dieses in das vorbereitete Reaktionsgefäß. Zentrifugieren Sie die Probe für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Hierdurch werden mögliche Hefen sedimentiert. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium. Fahren Sie nun mit Punkt 3 (Zelllyse) fort.

Hinweise:

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

(3) Zelllyse

Pipettieren Sie 70 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe und schütteln Sie die Proben bei 37°C und 1.400 rpm für 15 Minuten auf dem vorgeheizten Thermomixer. Zentrifugieren Sie die Proben anschließend 10 min bei 13.000 rpm.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Während die Proben zentrifugieren, tauschen Sie die Aufsätze des Thermomixers und fixieren 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 die erste Reihe der Mikrotiterplatte (Positionen A1 - H1) mit je 45 µl Testlösung D für eine Doppelbestimmung der Standards 1 bis 4. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Stellen Sie die befüllte Platte mit 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 80 µl einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

(4) Hybridisierung

Nehmen Sie die **Standards 1** bis **4** aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie je 10 µl Standard zur Testlösung D in die wie folgt festgelegten Positionen der Reihe 1 der Mikrotiterplatte. **Standard 1:** Position A1 und B1, **Standard 2:** Position C1 und D1, **Standard 3:** Position E1 und F1, **Standard 4:** Position G1 und H1.

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

Hinweis:

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

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

(5) 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 min bei 50°C und 500 rpm auf dem Thermomixer schütteln.

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

Vorbereitung weiterer Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro Probe (inklusive Standards) 100 µl Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen darin in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 8 Proben und 8 Standards benötigen Sie 1600 µl Waschlösung plus 16 µl Enzymlösung F.

Hinweise:

Vor der Entnahme von Enzymlösung F sollte diese durch einen kurzen Zentrifugationsschritt am Boden des Gefäßes gesammelt werden.

Nehmen Sie Enzymlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank.

Die 1:100 verdünnte Enzymlösung muss für jeden Test frisch angesetzt und kann in dieser Form nicht über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

(6) 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 durch Invertieren und leichtes Ausklopfen der Platte. Pipettieren Sie jeweils 100 µl 1:100 verdünnte Enzymlösung (**Enzymlösung F** (grüner Deckel) und **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Ist der Thermomixer auf eine Temperatur von mindestens 30°C abgekühlt, kann die Platte in den Thermomixer gestellt werden. Es wird nun für 10 min bei eingestellten 25°C und 500 rpm inkubiert.

(7) Waschen

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung durch Invertieren und leichtes Ausklopfen der Platte. 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 den Waschvorgang noch einmal.

Vorbereitung weitere Schritte:

Schalten Sie das Lesegerät ein und starten Sie den Computer.

(8) 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. Nach 2 - 15 min ist eine Blaufärbung in kontaminierten Proben sichtbar. Vergleichen Sie die Intensität der Färbung von Standard 2 mit der von Standard 1. Ist bei Standard 2 im Vergleich zu Standard 1 eine schwache Blaufärbung deutlich sichtbar, können alle Reaktionen durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung H** abgestoppt werden. Nach Zugabe der Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Stellen Sie die Mikrotiterplatte auf den Thermomixer und schütteln Sie ca. 10 sec. bei 500 rpm. Achten Sie darauf, dass evtl. entstandene Luftblasen entfernt werden.

Auswertung mit HybriScan®-Software

(9) Auswertung mit der HybriScan®-Software

Mit der Option **Ansicht** in der Menüleiste können Sie die für jede Position angezeigten Parameter ein- oder ausblenden. Standardmäßig werden die Nummern der 96 Positionen, der Faktor und die Zellzahl angezeigt (siehe unten). Haben Sie einen Drucker angeschlossen, können sie diese Darstellung der Messergebnisse drucken. Alternativ wählen Sie die Option **Report** und tragen Sie bei **Spalte** und **Zeile** die von Ihren Proben belegten Positionen ein.

Bsp.: Bei 16 Proben, inkl. Standards: Spalte 1 bis 3, Zeile A bis H. Klicken Sie auf **Report anzeigen**. Hier sehen Sie im oberen Bereich des Fensters das Ergebnis der mithilfe der Standards durchgeführten Regressionsanalyse in Form einer Regressionsgerade. Die durch rote Punkte angezeigten Messwerte der Standards sollten nah an der Regressionsgeraden (blaue Linie) liegen. Sie können nun über die Option **Drucken** die Ergebnisse ausdrucken und/oder über **Export** für die Verarbeitung in anderen Programmen wie Microsoft Excel exportieren.

Beenden Sie das Programm über die Funktion **Exit**.

Weitere Funktionen:

Über die Funktion **Vorlage erstellen** lassen sich für den routinemäßigen Ablauf die Probenamen immer wiederkehrender Proben (bei gleicher Positionierung) speichern und über die Funktion **Vorlage laden** auf die neuen Messwerte übertragen.

(10) Bewertung der Messergebnisse

Die HybriScan®-Software ermittelt mithilfe der Ergebnisse der Absorptionsmessung und der mitgeführten Standards den Zustand der untersuchten Proben. Auf Grundlage des Standards 1 (Mittelwert beider Messungen) wird ein Faktor ermittelt, um den die untersuchte Probe vom Standard 1 abweicht. Der Standard 1 entspricht einem Anteil von 0 Zellen (Nullprobe). Mit zunehmender Größe des Faktors erfolgt die grafische, farbige Darstellung in der Software von grün über gelb und rot nach schwarz. Diese farbige Darstellung ermöglicht eine schnelle, visuelle Erfassung von kontaminierten Proben. Mithilfe des Mittelwertes des Standards 1 und der Standardabweichung beider Messwerte wird weiterhin eine Bewertung der Probe vorgenommen. Liegt der Messwert der Probe höher als die Summe aus "Mittelwert Standard 1 plus 3mal Standardabweichung beider Messwerte" so wird eine Probe als kontaminiert bewertet.

Aus den Werten der Standardkonzentrationen (S1 bis S4) wird durch Auftragen der Konzentrationen gegen die optische Dichte und lineare Regression eine Eichkurve erstellt. Den optischen Dichten der Proben werden durch Interpolation aus der Eichkurve korrespondierende Zellzahlen zugeordnet.

Die HybriScan™-Software ermöglicht sowohl eine grafische als auch eine tabellarische Darstellung der Testergebnisse für die untersuchten Proben. Es werden optische Dichte und berechnete Zellzahl angegeben.

Leerwert und entsprechende Standards müssen sich unbedingt in den Vertiefungen A1 bis H1 befinden, da sonst eine falsche Auswertung durch die Software erfolgt.

Auswertung ohne HybriScan®-Software

(11) 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.

(12) Interne Kontrolle

Für eine interne Kontrolle der Testdurchführung empfehlen wir das Mitführen aller vier Standards. Setzen Sie für Standard S1 den Wert 0, Standard S2 1, Standard S3 3 und für Standard S4 den Wert 10 auf der Abszisse (x-Achse). Führen Sie eine lineare Regression mit den korrespondierenden Messwerten für S1 bis S4 durch. Die Gerade muss beim Messwert für Standard S1 die Y-Achse schneiden. Bei korrekt durchgeführten Analysen sollten die Messwerte möglichst nahe der Trendlinie liegen. Die Regressionsgerade dient lediglich der Überprüfung der Analysenqualität und nicht der Quantifizierung. Diese Verfahrensweise wird insbesondere für unerfahrene Anwender empfohlen.

Routinierte Anwender können sich auf Standard S1 und S3 beschränken. Diese werden für die qualitative Auswertung der Ergebnisse benötigt.

(13) Qualitative Auswertung

Für eine gültige Messung soll der Quotient, ermittelt aus dem MW der Positivkontrolle (S3) 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 (S3)

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.

(14) Quantitative Auswertung

Für eine quantitative (semi-quantitative) Auswertung erfolgt die Berechnung der Proben-Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Probe}} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} \times \text{Zellzahl}_{\text{Standard}}}{\text{MW}_{\text{OD}_{\text{Standard}}}}$$

Für die Berechnung der Zellzahl den Standard wählen, der der Proben-OD am nächsten liegt.

Zellzahlen der Standards:

S1 = 0

S2 = 100

S3 = 300

S4 = 1.000

Hinweis:

Eine quantitative Auswertung kann nur erfolgen, wenn die Nachweisgrenze erreicht wurde (siehe Produktspezifikation), die Messwerte im linearen Bereich liegen und keine Voranreicherung durchgeführt wurde!

Kurzprotokoll

1. 100 – 1000 ml Probe filtrieren (Vakuumfiltrationsanlage; Membranfilterscheibe, 0,45 µm Porendurchmesser)
2. Filterscheibe in 5 ml Anreicherungsmedium inkubieren (z.B. SSL-Broth, 26°C, ca. 18 - 24 h)
3. 2 ml Probe aus Anreicherungsmedium entnehmen und eine Spatelspitze Glasbeads zugeben, zentrifugieren (13.000 rpm, 2 min), anschließend Überstand vorsichtig entfernen und verwerfen
4. Pellet in 70 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren, mischen und 15 min bei 37°C und 1.400 rpm im Thermomixer inkubieren
5. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
6. pro Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren und ca. 5 min bei 500 rpm und 50°C im Thermomixer vortemperieren
7. 10 µl Überstand aus Schritt 5 dazu pipettieren (Reihe A1 – H1 ist für die entsprechenden Standards vorgesehen); Mikrotiterplatte abdecken und 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
8. Überführen von 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung in die Bindeplatte, 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
9. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung pipettieren und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
10. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 100 µl verdünnte Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren; 10 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
11. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und erneut waschen
12. 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 Thermomixer inkubieren
13. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
14. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung

So funktioniert's



1. Probe filtrieren
 (100-1000 ml AfG,
 15 min)



2. Filter inkubieren
 (z.B. SSL-Broth, 24h)



3. Zellyse
 (2ml Probe, 13.000 rpm;
 37°C, 45-60 min)



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



5. Immobilisierung
 (Binden des "Sandwich" an
 Bindeplatte, 10 min)



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



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



8. Messsignal auslesen



9. Auswerten
 (Auswerten der Messergebnisse
 mit der HybriScan®-Software,
 10 min)

Vorteile

- gleichzeitiger Nachweis von Hefearten wie *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulasporea* und *Candida*
- schnell, sensitiv, ohne PCR
- spezifisch für lebende Zellen
- Zeitersparnis 3-5 Tagen im Vergleich zu Plattentests
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik
- hohe Flexibilität (Gruppen- oder Art-spezifischer Nachweis)