

## Venor® GeM - Frequently Asked Questions

### Für welche Probenmaterialien ist Venor® GeM geeignet?

Mit Venor® GeM können Mykoplasmen in Zell- und Viruskulturen sowie viele andere biologische Proben direkt nachgewiesen werden. Zellkulturüberstände sind für die Testung besonders gut geeignet. Zellen sollten nicht in die Probe eingebracht werden, da sie die PCR-Reaktion inhibieren können. Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca.  $10^6$  Mykoplasmen/ml. Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung. Weiterhin können Gewebeextrakte, Cryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden.

### Wieviel Probe benötige ich und wann soll ich testen?

Venor® GeM benötigt nur  $2 \mu\text{l}$  Probe für einen Ansatz. Die Zellen sollten bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert werden. Die Mykoplasmen sollten dann eine ausreichende Konzentration im Überstand erreicht haben und eine Inhibition der PCR-Reaktion vermeidbar sein.

### Wie sensitiv ist Venor® GeM?

Venor® GeM ist das empfindlichste PCR Mykoplasmen-Detektions Kit, das es auf dem Markt gibt. Ein erfolgreicher Nachweis erfolgt bereits ab 2 Mykoplasmen pro Probenvolumen ( $2 \mu\text{l}$ ).

### Wie ist der Detektions-Bereich von Venor® GeM?

Venor® GeM detektiert mehr als 26 verschiedene Mykoplasmenarten. Eine vollständige Liste der Arten ist im Benutzerhandbuch aufgeführt.

### Ist die Intensität des PCR-Amplikons proportional zum Kontaminationsgrad?

Venor® GeM für die konventionelle PCR ist ein qualitativer Test auf Mykoplasmen-Kontaminationen. Eine Bande zwischen 265-278 bp zeigt ein positives Ergebnis unabhängig von der Intensität an. Grundsätzlich gilt: Eine Bande mit schwacher Intensität repräsentiert einen niedrigen Kontaminationsgrad, hingegen eine intensive Bande einen hohen Kontaminationsgrad. Für die Quantifizierung der Mykoplasmen-Kontamination ist Venor® GeM für die Real-Time PCR erhältlich.

### Wie interpretiere ich unspezifische Banden?

Ein positives Ergebnis liegt nur dann vor, wenn die Bandengröße mit der positiven Kontrolle korrespondiert. Ist die Bande hingegen länger bzw. kürzer, so ist das Ergebnis als negativ zu betrachten. Venor® GeM ist hoch empfindlich und detektiert eine große Bandbreite an Mykoplasmenarten. Unspezifisches Annealing kann nicht immer ausgeschlossen werden, tritt jedoch sehr selten zu beobachten. Diese unspezifischen Banden sind oftmals weniger intensiv und unterscheiden sich deutlich in der Größe vom Mykoplasmen-spezifischen Amplikon. Eine diffuse Bande kann bei 80-90 bp Länge auftreten. Diese Primer-Dimer-Bande ist technisch bedingt und beeinflusst die Genauigkeit der Ergebnisse nicht.

### Können die Proben gesammelt und später analysiert werden?

Nach der Hitzebehandlung des Zellkulturüberstandes ( $500 \mu\text{l}$  im  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß bei 10 min,  $95^\circ\text{C}$ ), können die Proben bis zur Analyse für mehrere Tage bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden. Für eine

längere Aufbewahrungszeit wird empfohlen, die Proben in ihrem nativen Zustand oder nach der Hitzeinaktivierung bei -20°C zu lagern.

#### Wie werden die PCR-Produkte gelagert?

Die PCR-Produkte sind bei Raumtemperatur ein bis zwei Tage stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten die PCR-Produkte bei -20°C aufbewahrt werden. Bei dieser Temperatur können sie länger als ein Jahr gelagert werden.

#### Welche Wasserqualität benötige ich für die Rehydratation?

Das Wasser für die Rehydratation muss frei von DNA sein. Wir empfehlen UV-bestrahltes Wasser. Zum Lösen der Proben eignen sich auch frisch destilliertes Wasser,  $\gamma$ -bestrahltes Wasser oder Wasser, das mit anderen Methoden DNA frei aufbereitet wurde. Minerva Biolabs bietet DNA-freies PCR-Wasser an (Art.-Nr. 55-0010).

#### Welche Kontrollen sollten mitgeführt werden?

Es wird sehr empfohlen sowohl die positive als auch die negative Kontroll-Reaktion für jede Testreihe auszuführen. Besonders wichtig ist die interne Amplifikationskontrolle, die auch gleichzeitig als Sensitivitätskontrolle fungiert. Die positive Kontrolle befindet sich in dem Gefäß mit grünem Deckel, die interne Kontrolle ist im Mastermix enthalten und die Negativkontrolle enthält DNA-freies Wasser.

#### Warum ist die interne Amplifikationskontrolle unbedingt notwendig?

Die interne Amplifikationskontrolle ist nötig, um die Qualität der PCR zu gewährleisten. Die Proben sollten von Kulturen stammen, die 80-90% konfluent waren. PCR-inhibierende Substanzen können in älteren Kulturen im Überstand akkumulieren. Das Auftreten der interne Kontrollbande bei 191 bp bestätigt, dass die Reaktion nicht inhibiert wurde und somit erfolgreich verlief.

#### Welche inhibitorischen Substanzen im Medium überalterter Kulturen stören die PCR?

Welche inhibitorischen Substanzen im Medium überalterter Kulturen auftreten, ist nicht genau bekannt. Es sind möglicherweise Stoffwechselprodukte, da frisches Serum bzw. Medium nicht stört (es könnte sich um Transkriptionsstopps handeln, wissenschaftliche Publikationen gibt es zu dieser Annahme jedoch nicht). Interessanterweise enthalten 37% der an die Minerva Biolabs GmbH zur Mykoplasmentestung verschickten Proben inhibitorische Substanzen. Grundregel: Wird das Medium gelb, ist die Inhibition da.

#### Verringert die interne Kontrolle die Sensitivität der PCR?

Nein, die interne Kontrolle verringert die Sensitivität nicht. Die Oligonukleotid-Primer und die Nukleotide sind optimal konzentriert, so dass sie keinen negativen Einfluss auf die Empfindlichkeit der PCR-Reaktion ausüben.

#### Welche Arten von Polymerasen können benutzt werden?

DNA Polymerasen mit einer 3'-5' Exonukleaseaktivität werden NICHT empfohlen (z.B. *Tli*, *Pfu*, und *Pwo*). Verwendbare DNA-Polymerasen sind *Taq*, *Tfl*, und *Tth*. Da fast jedes PCR-Labor *Taq* Polymerasen vorliegen hat, wird Venor® GeM aus Kosten- und Transportgründen ohne Polymerase geliefert. Eine auf Venor® GeM abgestimmte *Taq* Polymerase kann separat über Minerva Biolabs bezogen werden (Art.-Nr. 53-0200).

### Kann ein anderer Puffer verwendet werden?

Der Venor®GeM PCR 10x Reaction Buffer kann gegen einen Taq DNA-Polymerase-spezifischen Puffer ausgetauscht werden. In diesem Fall muss die Magnesium-Konzentration im Puffer auf 3.0 mM abgeglichen werden.

### Wann sollten Suspensionskulturen idealerweise getestet werden?

Bei Suspensionskulturen sollte nur der Überstand getestet werden. Zellen selber sollten nicht getestet werden, da nach der Lyse Zelltrümmer die PCR stören. Bei durchschnittlichen Titern von  $10^6$  und maximalen Titern von  $10^8$  befinden sich genügend Mykoplasmen im Überstand, um eine sensitive PCR zu garantieren.

### Welche Unterschiede gibt es zwischen Testkits und regulären Kits?

Der Unterschied zwischen einem Testkit und einem vollwertigem Kit liegt einzig in den Volumina zum Resuspendieren und in der Mastermix-Zusammensetzung. Der Testkit ist für 5 Reaktionen geeignet, den regulären Kit können sie für 25, 50, 100 oder 250 Reaktionen käuflich erwerben.

### Tritt Mycoplasma penetrans tatsächlich intrazellulär auf?

Diese Frage ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht genau zu beantworten. Wissenschaftliche Beweise, die diese Annahme unterstützen, fehlen. Ein Nachweis würde voraussichtlich auch bei der Testung von Überstand positiv verlaufen, da genügend Mykoplasmenpartikel aus abgestorbenen und lysierten Zellen vorliegen dürfte.

### Warum ist die Bande der Positivkontrolle im Gel nicht sichtbar?

Die Positivkontrolle wird aus Stabilitätsgründen in lyophilisiertem Zustand geliefert. Das Lyophilisat kann durch den Transport vom Boden des Röhrchens abgelöst worden sein. Daher muss das Röhrchen vor dem Öffnen unbedingt kurz zentrifugiert werden, um die DNA vollständig in Lösung zu bringen.

### Welche Konzentration hat die positive Kontrolle des Venor®GeM-Kits?

Die positive Kontrolle enthält Amplikon-DNA von relativ kleiner Fragmentgröße. Das Resuspendieren der DNA resultiert nicht in einer genauen Konzentration. Die positive Kontrolle dient allein dem Zweck, positive Ergebnisse durch einen Vergleich der Banden einfacher zu sehen. Die Konzentration der positiven Kontrolle variiert von Charge zu Charge. Zudem befindet sich die DNA nicht in dem Zustand, dass eine zuverlässige Quantifizierung gemäß der hohen Sensitivität des Testsystems erreicht werden könnte. Unsere Produkte sind lyophilisiert, um höchste Stabilität zu garantieren. Diese Bedingung ist jedoch nicht optimal, um eine genau definierte Menge DNA von der Gefäßwand für eine Quantifizierung vorzunehmen. Für eine genaue Quantifizierung empfehlen wir unsere Quantifizierungs-Standards (Art.-Nr. 52-0112).