

Art. Nr. / Order No. 11-8025/-8050/-8100/-8250

Venor[®] GeM-OneStep

Mycoplasma Detection Kit for endpoint PCR
version 1.0

Gebrauchsinformation / Instructions for Use

Reagenzien für 5/25/50/100/250 Reaktionen

Reagents for 5/25/50/100/250 reactions

Hersteller / Manufacturer:

Minerva Biolabs GmbH, Koepenicker Strasse 325, 12555 Berlin, Germany

ZUR ANWENDUNG IN DER FORSCHUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE
FOR USE IN RESEARCH AND QUALITY CONTROL



CELL CULTURE CONTAMINATION & QUALITY CONTROL
CLINICAL | WATER | VETERINARY DIAGNOSTICS
MYCOPLASMA | BACTERIA | VIRUSES



Symbole / Symbols



Chargen-Nr. / Lot No.



Artikel-Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



Enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Bestimmungen
Contains reagents for 25, 50, 100 or 250 tests



Hersteller / Manufacturer

ANWENDUNGSGEBIET

Der Venor®GeM-OneStep *Mycoplasma Detection Kit* dient der qualitativen Direktbestimmung von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben wie Zellkulturen, Zellkulturprodukten oder Kulturmedien.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Der Kit enthält Reagenzien für die Durchführung einer Endpunkt-PCR. Das für die Amplifikation gewählte Template ist innerhalb der Gattung *Mycoplasma* hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit Venor®GeM-OneStep können daher neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenarten *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene *Ureaplasma*-Spezies detektiert werden (siehe Kapitel „Analytische Charakteristika des Tests“).

Im Vergleich zu Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzmethoden oder der Kultur, mit denen nur frische und unbehandelte Proben getestet werden können, eignet sich der PCR-basierte Nachweis für eine Vielzahl an Probenmaterialien und hat sich insbesondere durch eine höhere Präzision und Sensitivität bewährt.

TESTPRINZIP

Die mitgelieferten Primer erlauben der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 267 bp und kann direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Der Reagenzienmix des Testsystems beinhaltet neben den Primern und dNTPs auch hot-start Polymerase und synthetische DNA für die Interne Amplifikationskontrolle. Die Interne Amplifikationskontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 191 bp großes Produkt und erscheint im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe.

Der *Primer/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP. Optional können so verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abgebaut und das Auftreten falsch positiver Ergebnisse minimiert werden. UNG ist nicht Bestandteil von Venor®GeM-OneStep.

ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei +2 bis +8 °C.

Das chargenspezifische Qualitätskontrollzertifikat (*Certificate of Analysis*) kann auf unserer Webseite heruntergeladen werden (www.minerva-biolabs.com).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl				Deckel- farbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 11-8025	50 Reaktionen Art. Nr. 11-8050	100 Reaktionen Art. Nr. 11-8100	250 Reaktionen Art. Nr. 11-8250	
<i>OneStep Mix</i>	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	10 x lyophilisiert	rot
<i>Rehydration Buffer</i>	1 x 1,3 ml	1 x 1,3 ml	2 x 1,3 ml	5 x 1,3 ml	blau
<i>Positive Control DNA</i>	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	grün
<i>10 mM Tris Buffer</i>	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	weiß

BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Der Venor®GeM-OneStep enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von Mykoplasmen. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- PCR-Gerät
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das PCR-Gerät
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen und Dispensieren des *OneStep Mixes* mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 µl)

PROBENMATERIAL

Zellkulturen sollten bei 90 bis 100 % Konfluenz getestet werden. Bei überalterten Kulturen kann es zur Anreicherung von Inhibitoren der PCR im Kulturmedium kommen, ggf. ist eine DNA-Extraktion durchzuführen. Im Zellkulturmedium enthaltene Penicillin oder Streptomycin hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Mykoplasmen oder die Sensitivität des Tests.

Zellkulturüberstände sind für die direkte Testung ohne Probenvorbereitung besonders gut geeignet. Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca. 10⁶ Mykoplasmen/ml. Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung.

Die PCR-Probe wird durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen werden dadurch lysiert und DNAsen inaktiviert. Durch Zentrifugieren werden störende Zelltrümmer abgetrennt:

1. 100 µl Probenmaterial (z.B. Zellkulturüberstand) in steriles Reaktionsgefäß geben, dicht verschließen
2. 5 min kochen bzw. bei 95 °C inkubieren
Vorsicht: Deckel kann sich öffnen und Aerosole können entstehen
3. für 5 Sekunden bei ca. 13.000 Umdrehungen/min zentrifugieren
4. 2 µl des Überstandes für den PCR-Test einsetzen

Zellen sollten nach Möglichkeit nicht direkt in die Probe eingebracht werden, da sie die PCR-Reaktion inhibieren können. Weiterhin können Serumkonzentration > 5 % (v/v) die PCR beeinflussen. Zellen wie auch Gewebeeextrakte, Cryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte können jedoch nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden. Der Kit wurde mit den folgenden Extraktionsverfahren validiert:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (Art. Nr. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit (Art. Nr. 51 304) „Protocol for Cultured Cells“

DNA-Extrakte und hitzeinaktivierte Proben lassen sich 6 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahren. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von < -18 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieser Kit ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt und darf ohne probenspezifische Validierung nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.

Dieser Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Das Probenmaterial muss als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

Dieser Kit enthält keine Gefahrstoffe und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Proben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

Symbole / Symbols



Chargen-Nr. / Lot No.



Artikel-Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



Enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Bestimmungen
Contains reagents for 25, 50, 100 or 250 tests



Hersteller / Manufacturer

ANWENDUNGSGBIET

Der Venor®GeM-OneStep *Mycoplasma Detection Kit* dient der qualitativen Direktbestimmung von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben wie Zellkulturen, Zellkulturprodukten oder Kulturmedien.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Der Kit enthält Reagenzien für die Durchführung einer Endpunkt-PCR. Das für die Amplifikation gewählte Template ist innerhalb der Gattung *Mycoplasma* hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit Venor®GeM-OneStep können daher neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenpezies *M. orale*, *M. hyorhins*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene *Ureaplasma*-Spezies detektiert werden (siehe Kapitel „Analytische Charakteristika des Tests“).

Im Vergleich zu Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzmethoden oder der Kultur, mit denen nur frische und unbehandelte Proben getestet werden können, eignet sich der PCR-basierte Nachweis für eine Vielzahl an Probenmaterialien und hat sich insbesondere durch eine höhere Präzision und Sensitivität bewährt.

TESTPRINZIP

Die mitgelieferten Primer erlauben der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 267 bp und kann direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Der Reagenzienmix des Testsystems beinhaltet neben den Primern und dNTPs auch hot-start Polymerase und synthetische DNA für die Interne Amplifikationskontrolle. Die Interne Amplifikationskontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 191 bp großes Produkt und erscheint im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe.

Der *Primer/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP. Optional können so verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abgebaut und das Auftreten falsch positiver Ergebnisse minimiert werden. UNG ist nicht Bestandteil von Venor®GeM-OneStep.

ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei +2 bis +8 °C.

Das chargenspezifische Qualitätskontrollzertifikat (*Certificate of Analysis*) kann auf unserer Webseite heruntergeladen werden (www.minerva-biolabs.com).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl				Deckel- farbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 11-8025	50 Reaktionen Art. Nr. 11-8050	100 Reaktionen Art. Nr. 11-8100	250 Reaktionen Art. Nr. 11-8250	
<i>OneStep Mix</i>	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	10 x lyophilisiert	rot
<i>Rehydration Buffer</i>	1 x 1,3 ml	1 x 1,3 ml	2 x 1,3 ml	5 x 1,3 ml	blau
<i>Positive Control DNA</i>	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	grün
<i>10 mM Tris Buffer</i>	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	weiß

BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Der Venor®GeM-OneStep enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von Mykoplasmen. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- PCR-Gerät
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das PCR-Gerät
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen und Dispensieren des *OneStep Mixes* mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 µl)

PROBENMATERIAL

Zellkulturen sollten bei 90 bis 100 % Konfluenz getestet werden. Bei überalterten Kulturen kann es zur Anreicherung von Inhibitoren der PCR im Kulturmedium kommen, ggf. ist eine DNA-Extraktion durchzuführen. Im Zellkulturmedium enthaltene Penicillin oder Streptomycin hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Mykoplasmen oder die Sensitivität des Tests.

Zellkulturüberstände sind für die direkte Testung ohne Probenvorbereitung besonders gut geeignet. Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca. 10⁶ Mykoplasmen/ml. Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung.

Die PCR-Probe wird durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen werden dadurch lysiert und DNAsen inaktiviert. Durch Zentrifugieren werden störende Zelltrümmer abgetrennt:

1. 100 µl Probenmaterial (z.B. Zellkulturüberstand) in steriles Reaktionsgefäß geben, dicht verschließen
2. 5 min kochen bzw. bei 95 °C inkubieren
Vorsicht: Deckel kann sich öffnen und Aerosole können entstehen
3. für 5 Sekunden bei ca. 13.000 Umdrehungen/min zentrifugieren
4. 2 µl des Überstandes für den PCR-Test einsetzen

Zellen sollten nach Möglichkeit nicht direkt in die Probe eingebracht werden, da sie die PCR-Reaktion inhibieren können. Weiterhin können Serumkonzentration > 5 % (v/v) die PCR beeinflussen. Zellen wie auch Gewebeeextrakte, Cryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte können jedoch nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden. Der Kit wurde mit den folgenden Extraktionsverfahren validiert:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (Art. Nr. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit (Art. Nr. 51 304) „Protocol for Cultured Cells“

DNA-Extrakte und hitzeinaktivierte Proben lassen sich 6 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahren. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von < -18 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieser Kit ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt und darf ohne probenspezifische Validierung nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.

Dieser Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Das Probenmaterial muss als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

Dieser Kit enthält keine Gefahrstoffe und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Proben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

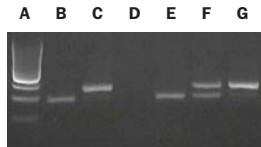
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei einem erfolgreichen Testansatz wird die Interne Kontrolle mit einer Bandengröße von 191 bp im Gel sichtbar. Enthält die Probe mehr als 5×10^6 Kopien/ml an Mykoplasmen-DNA wird die Interne Kontrolle mit ansteigender Mykoplasmenlast verdrängt und dann nicht mehr amplifiziert. In diesem Fall wird ein erfolgreicher Testansatz durch die Mykoplasmen-spezifische Bande angezeigt. Die *Positive Control DNA* enthält deutlich mehr als 5×10^6 Kopien/ml, um den Verlust durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen auszugleichen und verdrängt weitgehend die Interne Kontrolle.

Vereinzelt kann es zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen, die als schwache, meist diffuse Banden unterschiedlicher Größen im Gel sichtbar werden. Diese Banden werden durch unspezifisches Annealing bei der Verwendung von Proben mit mehr als $100 \mu\text{g/ml}$ DNA gebildet und bedeuten keine Kontamination, solange sie nicht die oben angegebenen Größen aufweisen. Primerdimere können eine diffuse Bande bei 80-90 bp bilden, jedoch ohne Auswirkungen auf die analytische Charakteristik des Tests.

Bei ersichtlicher Inhibition der PCR durch die Probe (geringere Bandenintensität im Vergleich zur Negativkontrolle) muss eine DNA-Extraktion durchgeführt und die Probe erneut getestet werden (siehe Kapitel „Probenmaterial“).

Nachweis von Mykoplasmen Bande bei ca. 267 bp	Interne Kontrolle Bande bei 191 bp	Interpretation
positiv	irrelevant	mit Mykoplasmen kontaminierte Probe
negativ	negativ	Inhibition der PCR oder fehlerhafter Testansatz
negativ	positiv	kein Nachweis von Mykoplasmen in der Probe



Gelbild für Venor® GeM-OneStep

A: 100 bp DNA Leiter
B: Negativkontrolle
C: Positivkontrolle
D: inhibierte Probe
E: negative Probe
F: positive Probe, schwach kontaminiert
G: positive Probe, stark kontaminiert

ANALYTISCHE CHARAKTERISTIKA DES TESTS

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze hängt von der Mykoplasmenart ab. Die 100 %ige Erkennung (Cut-off Grenze) liegt für alle getesteten Spezies deutlich unter 20 Genome/PCR.

Art	Cut-off (100 % Nachweis) [Genome/PCR]
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	< 20
<i>Mycoplasma fermentans</i>	< 10
<i>Mycoplasma synoviae</i>	< 20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	< 20
<i>Spiroplasma citri</i>	< 20

Kreuzreaktivität und Spezifität

Eine Kreuzreaktivität mit DNA eukaryontischen Ursprungs konnte nicht gefunden werden, jedoch kann es bei sehr hoher DNA-Last zum Auftreten einzelner diffuser Banden durch Überladung kommen (vgl. „Interpretation der Ergebnisse“). Der Kit weist keine der phylogenetisch verwandten Mikroorganismen *Clostridium*, *Lactobacillus* und *Streptococcus* oder den Wasserkeim *Burgholderia* nach. Folgende Arten wurden mit vergleichbarer Sensitivität detektiert:

Art	Amplikongröße [bp]	Art	Amplikongröße [bp]
<i>Mycoplasma orale</i>	266	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	273	<i>Mycoplasma cloacale</i>	266
<i>Mycoplasma penetrans</i>	274	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	265
<i>Mycoplasma pirum</i>	274	<i>Mycoplasma synoviae</i>	266
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	273	<i>Mycoplasma salvarium</i>	266
<i>Mycoplasma fermentans</i>	267	<i>Mycoplasma faucium</i>	265
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	268	<i>Mycoplasma hominis</i>	266
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	268	<i>Mycoplasma genitalium</i>	273
<i>Mycoplasma falconis</i>	268	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	267
<i>Mycoplasma arthritis</i>	267	<i>Mycoplasma caprine</i>	267
<i>Mycoplasma arginini</i>	267	<i>Mycoplasma agalactica</i>	267
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	267	<i>Mycoplasma timone</i>	266
<i>Mycoplasma opalescens</i>	266	<i>Spiroplasma citri</i>	268
<i>Mycoplasma primatum</i>	267		

Eine große Anzahl von Mykoplasmensequenzen wurde veröffentlicht. Die Primer des Kits wurden mit der NCBI Datenbank hinsichtlich Homologien innerhalb der Zielregion der 16S rRNA abgeglichen. Die Tabelle zeigt Mykoplasmenarten mit relevanten Sequenzhomologien und größter Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-Ergebnisses.

<i>M. agassizii</i>	<i>M. canadense</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. caviae</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. glycophilum</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. sualvi</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. citelli</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. tumidae</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. indienne</i>	<i>M. simbae</i>	<i>M. verecundum</i>

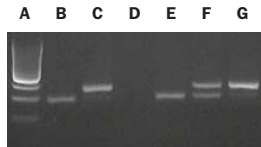
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei einem erfolgreichen Testansatz wird die Interne Kontrolle mit einer Bandengröße von 191 bp im Gel sichtbar. Enthält die Probe mehr als 5×10^6 Kopien/ml an Mykoplasmen-DNA wird die Interne Kontrolle mit ansteigender Mykoplasmenlast verdrängt und dann nicht mehr amplifiziert. In diesem Fall wird ein erfolgreicher Testansatz durch die Mykoplasmen-spezifische Bande angezeigt. Die *Positive Control DNA* enthält deutlich mehr als 5×10^6 Kopien/ml, um den Verlust durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen auszugleichen und verdrängt weitgehend die Interne Kontrolle.

Vereinzelt kann es zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen, die als schwache, meist diffuse Banden unterschiedlicher Größen im Gel sichtbar werden. Diese Banden werden durch unspezifisches Annealing bei der Verwendung von Proben mit mehr als $100 \mu\text{g/ml}$ DNA gebildet und bedeuten keine Kontamination, solange sie nicht die oben angegebenen Größen aufweisen. Primerdimere können eine diffuse Bande bei 80-90 bp bilden, jedoch ohne Auswirkungen auf die analytische Charakteristik des Tests.

Bei ersichtlicher Inhibition der PCR durch die Probe (geringere Bandenintensität im Vergleich zur Negativkontrolle) muss eine DNA-Extraktion durchgeführt und die Probe erneut getestet werden (siehe Kapitel „Probenmaterial“).

Nachweis von Mykoplasmen Bande bei ca. 267 bp	Interne Kontrolle Bande bei 191 bp	Interpretation
positiv	irrelevant	mit Mykoplasmen kontaminierte Probe
negativ	negativ	Inhibition der PCR oder fehlerhafter Testansatz
negativ	positiv	kein Nachweis von Mykoplasmen in der Probe



Gelbild für Venor® GeM-OneStep

- A:** 100 bp DNA Leiter
- B:** Negativkontrolle
- C:** Positivkontrolle
- D:** inhibierte Probe
- E:** negative Probe
- F:** positive Probe, schwach kontaminiert
- G:** positive Probe, stark kontaminiert

ANALYTISCHE CHARAKTERISTIKA DES TESTS

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze hängt von der Mykoplasmenart ab. Die 100 %ige Erkennung (Cut-off Grenze) liegt für alle getesteten Spezies deutlich unter 20 Genome/PCR.

Art	Cut-off (100 % Nachweis) [Genome/PCR]
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	< 20
<i>Mycoplasma fermentans</i>	< 10
<i>Mycoplasma synoviae</i>	< 20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	< 20
<i>Spiroplasma citri</i>	< 20

Kreuzreaktivität und Spezifität

Eine Kreuzreaktivität mit DNA eukaryontischen Ursprungs konnte nicht gefunden werden, jedoch kann es bei sehr hoher DNA-Last zum Auftreten einzelner diffuser Banden durch Überladung kommen (vgl. „Interpretation der Ergebnisse“). Der Kit weist keine der phylogenetisch verwandten Mikroorganismen *Clostridium*, *Lactobacillus* und *Streptococcus* oder den Wasserkeim *Burgholderia* nach. Folgende Arten wurden mit vergleichbarer Sensitivität detektiert:

Art	Amplikongröße [bp]	Art	Amplikongröße [bp]
<i>Mycoplasma orale</i>	266	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	273	<i>Mycoplasma cloacale</i>	266
<i>Mycoplasma penetrans</i>	274	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	265
<i>Mycoplasma pirum</i>	274	<i>Mycoplasma synoviae</i>	266
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	273	<i>Mycoplasma salivarium</i>	266
<i>Mycoplasma fermentans</i>	267	<i>Mycoplasma faucium</i>	265
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	268	<i>Mycoplasma hominis</i>	266
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	268	<i>Mycoplasma genitalium</i>	273
<i>Mycoplasma falconis</i>	268	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	267
<i>Mycoplasma arthritis</i>	267	<i>Mycoplasma caprine</i>	267
<i>Mycoplasma arginini</i>	267	<i>Mycoplasma agalactica</i>	267
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	267	<i>Mycoplasma timone</i>	266
<i>Mycoplasma opalescens</i>	266	<i>Spiroplasma citri</i>	268
<i>Mycoplasma primatum</i>	267		

Eine große Anzahl von Mykoplasmensequenzen wurde veröffentlicht. Die Primer des Kits wurden mit der NCBI Datenbank hinsichtlich Homologien innerhalb der Zielregion der 16S rRNA abgeglichen. Die Tabelle zeigt Mykoplasmenarten mit relevanten Sequenzhomologien und größter Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-Ergebnisses.

<i>M. agassizii</i>	<i>M. canadense</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. caviae</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. glycophilum</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. sualvi</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. citelli</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. tumidae</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. simbae</i>	<i>M. verecundum</i>

INDICATION

The Venor®GeM-OneStep *Mycoplasma Detection Kit* is used for direct detection of mycoplasma contamination in cell cultures, cell culture derived biologicals and cell culture media.

EXPLANATION OF THE TEST

Venor®GeM-OneStep utilizes the endpoint polymerase chain reaction (PCR), which was established as the method of choice for highest sensitivity in the detection of mycoplasma contamination in cell cultures and other cell culture derived biologicals. The kit allows the detection of *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, usually encountered as contaminants in cell cultures, but also *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* and *Ureaplasma* species (see list of detected mycoplasma in section "Analytical Characteristics of the Test"). Eukaryotic and bacterial DNA is not amplified by Venor®GeM-OneStep. Only one protocol is needed for the detection of all mycoplasma species. The detection procedure can be performed within 3 hours. Compared with the detection by luminescence-linked enzymology, fluorescent staining methods or culture, sample do not need to be vital. In addition PCR is characterized by a higher sensitivity and precision.

TEST PRINCIPLE

Mycoplasma are specifically detected by amplifying a highly conserved rRNA operon, or more specifically, the 16S rRNA coding region in the mycoplasma genome. The generated amplicon shows a size of approx. 267 bp. The kit also provides internal control DNA and hot-start polymerase already included in the reaction mix. The internal amplification control DNA indicates a successfully performed reaction by a 191 bp band on the agarose gel. The *OneStep Mix* contains dUTP instead of dTTP, so the option is available to degrade amplicons from previous analysis by use of uracil-DNA glycosylase (UNG). Thus, the occurrence of false-positive result can be minimized. UNG is not part of Venor®GeM-OneStep.

REAGENTS

Each kit contains reagents for 25, 50, 100 or 250 reactions. The expiry date of the unopened package is marked on the package label. The kit components are stored until use at +2 to +8 °C. The lot specific quality control certificate (*Certificate of Analysis*) can be downloaded from our website (www.minerva-biolabs.com).

Kit Component Label Information	Quantity				Cap Color
	25 reactions Order No. 11-8025	50 reactions Order No. 11-8050	100 reactions Order No. 11-8100	250 reactions Order No. 11-8250	
<i>OneStep Mix</i>	1 x lyophilized	2 x lyophilized	4 x lyophilized	10 x lyophilized	red
<i>Rehydration Buffer</i>	1 x 1.3 ml	1 x 1.3 ml	2 x 1.3 ml	5 x 1.3 ml	blue
<i>Positive Control DNA</i>	1 x lyophilized	1 x lyophilized	1 x lyophilized	1 x lyophilized	green
<i>10 mM Tris Buffer</i>	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	white

NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The Venor®GeM-OneStep *Mycoplasma Detection Kit* contains the reagents for the specific detection of mycoplasma. General industrial supplies and reagents, usually available PCR laboratories are not included:

- PCR device
- PCR reaction tubes for the specific PCR device
- Micro centrifuge for 1.5 ml reaction tubes
- Pipettes with corresponding filter tips to prepare and dispense the reaction mix (10, 100 und 1000 µl)

SPECIMEN

Samples should be derived from cultures which are at 90-100 % confluence. PCR inhibiting substances may accumulate in the medium of older cultures. Penicillin or streptomycin in the culture media do not inhibit mycoplasma or affect test sensitivity. Cell culture supernatant is highly recommended to test for mycoplasma without further sample preparation. With average titres at 10⁶ particles/ml and a maximum titre at 10⁸ particles/ml sufficient mycoplasma DNA will be present in the supernatant to guarantee a sensitive PCR even for cell wall associated species. Templates for PCR analysis are prepared by boiling the supernatant of cell cultures for 5 minutes as follows:

1. Transfer 100 µl of supernatant from the test culture to a sterile micro centrifuge tube. The lid should be tightly sealed to prevent opening during heating.
2. Boil or incubate the sample supernatant at 95 °C for 5 minutes.
3. Briefly centrifuge (5 seconds) the sample supernatant at approx. 13,000 rpm to pellet cellular debris before adding to the PCR mixture.
4. Use 2 µl directly for PCR.

Cell pellets should not be tested directly, since debris will interfere with the PCR reaction. However, cell pellets as well as fetal calf serum, vaccines, cryo stocks and paraffin-embedded samples can be tested following DNA extraction. The assay was validated using the following extraction procedures:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (No. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit (No. 51 304) "Protocol for Cell Culture"

DNA extracts and heat-inactivated samples can be kept for 6 days at +2 to +8 °C. Longer storage times require a temperature of -18 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

PRECAUTIONS

Venor®GeM-OneStep is intended for research use only. Not for clinical diagnostics or testing of human samples without extensive validation.

This kit should be used only by trained persons.

All samples should be considered potentially infectious and handled according to local or national regulations.

This kit does not contain hazardous substances and may be disposed of according to local regulations.

Cross contamination may lead to false-positive results. The test should be performed according to good laboratory practice.

TEST PROCEDURE

The test should be carried out with negative and positive controls and samples in duplicate. All reagents and samples must be equilibrated to +2 to +8 °C prior use.

1. Rehydration of the reagents

After reconstitution, the reagents should be stored at below -18 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided and the reconstituted reagents (*OneStep Mix* and the *Positive Control DNA*) stored in aliquots.

1.	<i>OneStep Mix</i> <i>Positive Control DNA</i>	red cap green cap	Spin all lyophilized components for 5 sec at maximum speed of the mini centrifuge
2.	<i>OneStep Mix</i>	red cap	Add 600 µl <i>Rehydration Buffer</i> (blue cap) <u>For sample kit only:</u> Add 120 µl PCR grade Water
3.	<i>Positive Control DNA</i>	green cap	Add 300 µl of 10 mM <i>Tris Buffer</i> (white cap)
4.	<i>OneStep Mix</i> <i>Positive Control DNA</i>	red cap green cap	Incubate 5 min at room temperature
5.	<i>OneStep Mix</i> <i>Positive Control DNA</i>	red cap green cap	Vortex DNA briefly and spin for 5 sec

2. Loading the test tubes

1. Aliquot 23 µl of *OneStep Mix* to each PCR tube.
2. Negative Controls: add 2 µl elution buffer from DNA extraction kit (ref. chapter "Specimen") or 10 mM *Tris Buffer* (white cap).
3. Samples: add 2 µl of cell culture supernatant or DNA extract.
4. Positive Control: add 2 µl Positive Control DNA (green cap).
5. Close and spin all PCR tubes briefly, load the PCR cycler and start the program.

The pipetting sequence should be respected and the tubes closed after each sample load.

3. Starting the reaction

1. Load the cycler, check each PCR tube and the cycler lid for tight fit.
Program the PCR cycler or check stored temperature profiles.
1 cycle 94 °C for 2 min
39 cycles 94 °C for 30 sec
 55 °C for 30 sec
 72 °C for 30 sec
cool down to 4 °C to 8 °C
3. Start the program.

4. Result reading

1. Cast a 1.5 % standard agarose gel including DNA stain (maximal 5 mm thick, 5 mm comb).
2. Load 5 µl of each PCR reaction, mixed with bromophenol blue loading buffer per lane (only bromophenol blue in a low concentration should be used as a run marker).
3. Stop electrophoresis after 2 cm run distance (depending on the electrophoresis chamber used run for approx. 20 minutes at 100 V).
4. Result reading:
Internal control 191 bp
Mycoplasma spp. 265-278 bp

NOTES ON THE TEST PROCEDURE

1. This leaflet must be widely understood for a successful use of Venor®GeM-OneStep. The reagents supplied should not be mixed with reagents from different lots and used as an integral unit. The reagents of the kit should not be used beyond its shelf life.
2. Any deviation from the test method can affect the results.
3. Inhibition may be caused by the sample matrix, but also by sample elution buffer of DNA extraction kits not recommended or validated. Negative controls should always be completed with the use of sample elution buffer.
4. For each test setup, at least one negative control should be included, possibly reflecting sample preparation. Positive controls facilitate the evaluation of the test.
5. The use of control samples is advised to secure the day-to-day validity of results. The controls should be carried out in the same manner as the samples. It is recommended to run laboratory specific control samples with a high, medial and low (e.g. 3x LOD₉₅) level. Participation in external quality control programs such as offered by Minerva Biolabs is recommended.

INTERPRETATION OF RESULTS

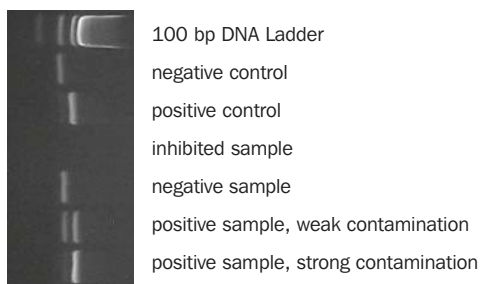
If Internal Control DNA was used, a distinct 191 bp band should appear in every lane indicating a successfully performed PCR. This band may fade out with increased amounts of target amplicon formed, caused by mycoplasma DNA loads of $> 5 \times 10^6$ copies/ml. The initial concentration of positive control DNA exceeds 5×10^6 copies/ml in order to account for DNA loss resulting from repeated freezing and thawing. Consequently, the internal control is usually not visible in the positive control reaction.

Rarely unspecific PCR products can be formed and become visible in the gel as faint, diffuse bands of different sizes (not 190 bp or 267 bp), but do not indicate positive results. These unspecific products are mainly caused by non-specific annealing due to overloading the PCR reaction with samples containing more than 100 $\mu\text{g/ml}$ of DNA. Possible primer self-annealing produces another band of 80-90 bp in length, but does not affect the precision or results of the test.

In apparent inhibition of PCR by the sample (lower band intensity compared to negative control) a DNA extraction has to be performed and the sample will be tested again (see chapter "Specimen").

Detection of <i>Mycoplasma</i> band at approx. 267 bp	Internal control band at 191 bp	Interpretation
positive	irrelevant	mycoplasma present in the sample
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	no mycoplasma detectable in the sample

A typical gel figure is shown below:



ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

Analytical Sensitivity

The detection limit depends on the species. The 100 % detection (cut off limit) was found for all tested species below 20 genomes/PCR.

Species	Cut-off (100 % detection) [genomes/PCR]
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	< 20
<i>Mycoplasma fermentans</i>	< 10
<i>Mycoplasma synoviae</i>	< 20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	< 20
<i>Spiroplasma citri</i>	< 20

Cross-reactivity

A cross-reactivity with eukaryotic DNA origin could not be found. Rarely unspecific PCR products can be formed and become visible in the gel as faint, diffuse bands of different sizes due to overloading the PCR (ref. chapter "Interpretation of Results"). The kit is also not detecting any of the phylogenetically related microorganisms, *Clostridium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*. Likewise, the water-born germ *Burkholderia* is not detected. The following species were tested with Venor[®]GeM-OneStep.

Species	Amplicon Size [bp]	Species	Amplicon Size [bp]
<i>Mycoplasma orale</i>	266	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	273	<i>Mycoplasma cloacale</i>	266
<i>Mycoplasma penetrans</i>	274	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	265
<i>Mycoplasma pirum</i>	274	<i>Mycoplasma synoviae</i>	266
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	273	<i>Mycoplasma salivarium</i>	266
<i>Mycoplasma fermentans</i>	267	<i>Mycoplasma faucium</i>	265
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	268	<i>Mycoplasma hominis</i>	266
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	268	<i>Mycoplasma genitalium</i>	273
<i>Mycoplasma falconis</i>	268	<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>	267
<i>Mycoplasma arthritis</i>	267	<i>Mycoplasma caprine</i>	267
<i>Mycoplasma arginini</i>	267	<i>Mycoplasma agalactica</i>	267
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	267	<i>Mycoplasma timone</i>	266
<i>Mycoplasma opalescens</i>	266	<i>Spiroplasma citri</i>	268
<i>Mycoplasma primatum</i>	267		

A large number of *Mycoplasma* sequences have been published. The primers of the kit were aligned with the NCBI data base and inspected for homologies within the target region of the 16S rRNA. The table shows mycoplasma species with relevant sequence homologies and highest presumption of a positive PCR result.

<i>M. agassizii</i>	<i>M. canadense</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. caviae</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. glycophilum</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. suavi</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. citelli</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. tumidae</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. indiane</i>	<i>M. simbae</i>	<i>M. verecundum</i>

Limited Product Warranty

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

Trademarks

Venor® is a registered trademark of Minerva Biolabs GmbH, Germany.

QIAamp® is a registered trademark of QIAGEN, Germany.

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250	MB Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	50/100/200/250 units
53-1050/-1100/-1200/-1250	MB Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	50/100/200/250 units

Detection Kits for endpoint PCR

11-1025/-1050/-1100/-1250	Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	25/50/100/250 tests
11-7024/-7048/-7096/-7240	Venor®GeM Advance Mycoplasma Detection Kit	24/48/96/240 tests
12-1025/-1050/-1100/-1250	Onar®EUB Bacteria Detection Kit	25/50/100/250 tests

Diagnostic Kits for qPCR

11-4025/100/250	Venor®GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit	25/100/250 tests
12-2025/100/250	Onar®-qEUB Bacteria Detection Kit	25/100/250 tests

Mycoplasma Elimination

10-0200/0500/1000	Mynox® Mycoplasma Elimination Reagent	2/5/10 treatments
10-0201/0501/1001	Mynox®Gold Mycoplasma Elimination Reagent	2/5/10 treatments

Quantification Standards, 100 μ l each, 1x10⁸ genomes/ μ l

52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
52-0129	<i>Mycoplasma arginini</i>
52-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i>
52-0130	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i>
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
52-0124	<i>Mycoplasma synoviae</i>
52-0164	<i>Spiroplasma citri</i>

Genomic DNA Extracts, 100 μ l each, +/- 10 ng / 100 μ l (selection)

51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112
51-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129
51-0162	<i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162
51-0195	<i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>Mycoplasma penetrans</i> , NC 11746

DNA Remover™

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250 ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottles	4 x 500 ml

Extraction Kit

56-1100	MB DNA Extraction Kit	100 extractions
---------	-----------------------	-----------------

Mycoplasma Off®

15-1000	Surface Disinfectant Spray, spray bottle	1000 ml
15-5000	Surface Disinfectant Spray, refill bottles	5 x 1000 ml

Mycoplasma Off® Wipes

15-1001	Surface Disinfectant Wipes	120 wipes
15-5001	Surface Disinfectant Wipes, refill sachets	5 x 120 wipes

ZellShield®

13-0050/-0150	Contamination Prevention Reagent 100x concentrate	50 ml/ 3 x 50 ml
---------------	---------------------------------------------------	------------------

Last technical revision: May 2011

Manufacturer

Minerva Biolabs GmbH
Koeppenicker Str. 325
D-12555 Berlin
Germany

Ordering

Tel. +49 (0)30 2000 437-0
Fax +49 (0)30 2000 437-9
order@minerva-biolabs.com

Product Information

www.minerva-biolabs.com
info@minerva-biolabs.com

Technical Service

Tel. +49 (0)30 2000 437-0
support@minerva-biolabs.com

Made in Germany

Minerva Biolabs GmbH develops and manufactures products in accordance with EN ISO 9001:2008 and EN ISO 13485:2003 quality system requirement.
Reg.No. SY 60026567 0001 & SX 60025009 0001



...as precise as diagnostics should be™