

Art. Nr. / Order No. 52-0115

Quantification Standard

Mycoplasma gallisepticum Titrated Genomic DNA

Gebrauchsinformation / Instructions for Use

Reagenzien für 10 Verdünnungsreihen

Reagents for 10 dilution series

**FOR PROFESSIONAL USE ONLY!
NUR FÜR ERFAHRENE ANWENDER!**

Symbole / Symbols



Chargen-Nr. / Lot No.



Artikel-Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



**Enthält Reagenzien für 10 Anwendungen
Contains reagents for 10 sets**



Hersteller / Manufacturer

ANWENDUNGSGBIET

Der *Quantification Standard Mycoplasma gallisepticum* dient als Amplifikations- und Sensitivitätskontrolle bei der Durchführung von DNA-Amplifikationstests mit Endpunktbestimmung (gelbasierte Auswertung) oder für die quantitative, real-time PCR.

ERKLÄRUNG DES PRODUKTES

Bei diesem Produkt handelt es sich um ein Isolat genomischer DNA aus *Mycoplasma gallisepticum*. Zur Gewinnung der Mikroorganismen wird eine spezielle Flüssigkultur mit einem Isolat einer frühen Passage von *Mycoplasma gallisepticum* (*early passage strain*, NCTC 10115) beimpft, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase durch wiederholtes Waschen gereinigt und durch Zentrifugieren konzentriert. Die DNA wurde klassisch mit Phenol-Chloroform extrahiert und anschließend über Adsorptionschromatografie gereinigt. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch (abgeglichen gegen ausgewogene Kalbsthymus-DNA) und mittels qPCR (abgeglichen gegen genau quantifizierte Calibrator-Plasmide) bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde mit klassischem TE80-Puffer eingestellt.

PRINZIP

Bei der quantitativen PCR (real-time PCR) kann der *Quantification Standard* zur Erstellung von Standardreihen dienen. Dazu wird die Ausgangslösung in 1:10 Verdünnungsstufen mit dem mitgelieferten *Tris Buffer* verdünnt und als Probe in der PCR eingesetzt. Die Software der einzelnen qPCR-Geräte berechnet aus den generierten Daten eine Standardreihe, mit deren Hilfe unbekannte DNA-Konzentrationen bestimmt werden können.

ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 10 Verdünnungsreihen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei < -18 °C. Häufiges Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Der angebrochene Kit kann bei steriler Handhabung für mindestens 6 Monate bei +2 bis +8 °C gelagert werden.

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

Reagenz	Anzahl/Menge	Deckelfarbe
<i>Quantification Standard</i> 1x10 ⁶ Genome/μl	100 μl	grün
<i>Tris Buffer</i> 10 mM Tris-HCl, pH 8,5	3 x 1 ml	weiß

BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Der Kit enthält die Reagenzien für die Herstellung der Verdünnungsreihen, allgemein übliche Verbrauchsmaterialien eines molekularbiologischen Labors sind jedoch nicht enthalten. Dazu zählen:

- 1,5 ml Reaktionsgefäß, DNA- und RNA-frei
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen der Verdünnungsstufen mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 μl)
- Vortexer

VORSICHTSMAßNAHMEN

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

Dieser Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

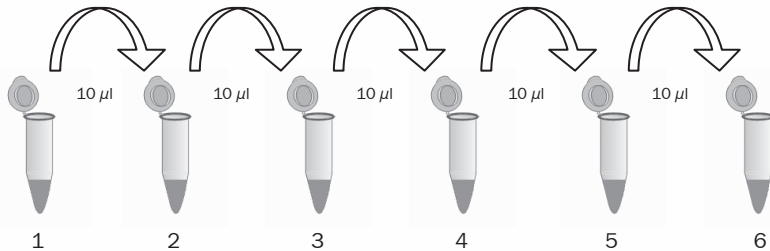
Dieser Kit enthält keine Gefahrstoffe oder infektiöses Material und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

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.

DURCHFÜHRUNG

1. Herstellung der Verdünnungsreihe

1. Die DNA-Lösung und der mitgelieferte *Tris Buffer* werden zügig aufgetaut.
2. Sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße werden fortlaufend nummeriert und mit je 90 μl *Tris Buffer* befüllt.
3. Der *Quantification Standard* wird kurz (1 bis 2 Sekunden) bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
4. In das Reaktionsgefäß Nr. 1 werden 10 μl des *Quantification Standards* gegeben, das Gefäß verschlossen und für kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
5. 10 μl des Inhalts von Reaktionsgefäß Nr. 1 werden in das Reaktionsgefäß Nr. 2 überführt, das Reaktionsgefäß verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
6. 10 μl des Inhalts von Reaktionsgefäß Nr. 2 werden in das Reaktionsgefäß Nr. 3 überführt, das Reaktionsgefäß verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
7. Für die weiteren Reaktionsgefäße der Verdünnungsreihe wird in gleicher Weise verfahren.



2. Durchführung der PCR

Zur Durchführung des Amplifikationstests wird die Verwendung eines validierten PCR-Assays (z.B. Minerva Biolabs, Venor[®]GeM-qEP, Bestellnr. 11-4025) für die qPCR empfohlen. Die Anwendung erfolgt gemäß der Gebrauchsinformation des Kits, wobei die hergestellten Verdünnungen als Probe eingesetzt werden. Bei qPCR-Geräten müssen die PCR-Ansätze der Standardreihe als Standard markiert und die vorgelegten Konzentrationen angegeben werden. Nur so kann die Software nach Beendigung der Reaktion die Eigenschaften der Standardreihe berechnen. Die eingesetzte Menge an Probe bestimmt die Genomanzahl pro PCR-Ansatz:

Reaktionsgefäß Nr.	2 μl Probenvolumen	5 μl Probenvolumen	10 μl Probenvolumen
1	2×10^5 Genomkopien	5×10^5 Genomkopien	1×10^6 Genomkopien
2	2×10^4 Genomkopien	5×10^4 Genomkopien	1×10^5 Genomkopien
3	2×10^3 Genomkopien	5×10^3 Genomkopien	1×10^4 Genomkopien
4	200 Genomkopien	500 Genomkopien	1000 Genomkopien
5	20 Genomkopien	50 Genomkopien	100 Genomkopien
6	2 Genomkopien	5 Genomkopien	10 Genomkopien

3. Auswertung

In der qPCR müssen die Ct-Werte der Verdünnungsstufen bei Verwendung eines validierten PCR-Assays mit steigender DNA-Konzentration linear abnehmen. Die mit dem real-time PCR-Gerät mitgelieferte Software berechnet aus den angegebenen DNA-Konzentrationen und den dazugehörigen Ct-Werten eine Standardkurve mit zugehöriger Steigung. Außerdem werden Proben mit unbekannter Konzentration automatisch anhand ihrer Ct-Werte mit der Standardkurve verglichen und so Konzentrationen zugeordnet.

Folgende grafische Darstellungen wurden mit dem Venor®GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs GmbH) auf dem LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) generiert.

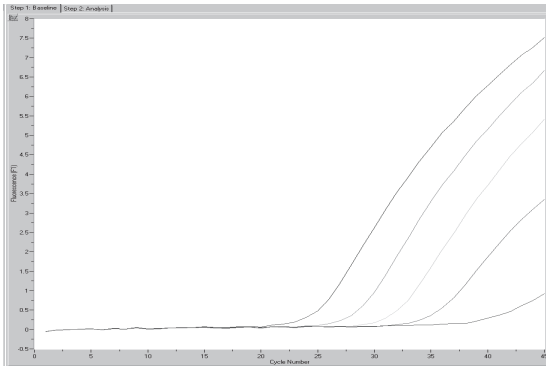


Abb. 1: Amplifikation der Verdünnungsreihe mit 10^4 bis 10 Genomkopien von *Mycoplasma pneumoniae* pro PCR-Ansatz. Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal 1.

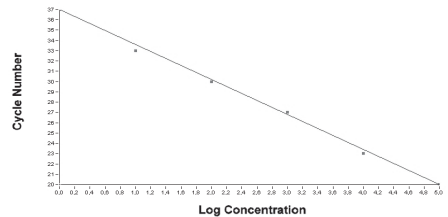


Abb. 2: Standardreihe unter Verwendung der Second Derivative Maximum - Methode des LightCycler® und der Daten aus Abb. 1

INDICATION

Genomic DNA of *Mycoplasma gallisepticum* can be used as amplification and sensitivity control of end point (gel-based evaluation) or quantitative, real-time PCR.

EXPLANATION OF THE TEST

This product provides isolated genomic DNA from *Mycoplasma gallisepticum*. To obtain the microorganisms a special liquid culture medium was inoculated with an early passage strain of *Mycoplasma gallisepticum* (NCTC 10115) and harvested at the end of the logarithmic growth phase by repeated washing and centrifugation. The DNA was extracted with a classic phenol-chloroform protocol and further purified with adsorption chromatography. The concentration of the DNA was quantified photometrically (calibrated to weight standards) and by qPCR (compared against exactly quantified calibrator plasmids). The DNA concentration was adjusted with regular TE80 buffer.

TEST PRINCIPLE

Pure and titrated genomic DNA can be used as amplification and sensitivity control of end point PCR (gel-based evaluation). For quantitative PCR the Quantification Standard can serve for creating standard curves by using dilutions of the material as sample in the PCR. The software of various devices will be able to calculate from qPCR data corresponding concentrations and will generate a standard curve, which can be used to determine unknown DNA concentrations.

REAGENTS

Each kit contains reagents for 10 dilution series. The expiry date of the unopened package is marked on the package label. The kit components are stored until use below -18 °C until use. Repeated freezing and thawing should be avoided. The opened kit is stable for 6 months at +2 to +8 °C if used under sterile conditions. The lot specific quality control certificate (*Certificate of Analysis*) can be downloaded from our website (www.minerva-biolabs.com).

Kit Component	Quantity	Cap Color
Quantification Standard 1x10 ⁶ genomes/ μ l	100 μ l	green
<i>Tris Buffer</i> 10 mM Tris-HCl, pH 8.5	3 x 1 ml	white

NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The kit contains the reagents for the preparation of 10 dilution series. General industrial supplies and reagents, usually available in molecular biology laboratories are not included:

- 1.5 ml reaction tubes, DNA- and RNA-free
- Micro centrifuge for 1.5 ml reaction tubes
- Pipettes with corresponding filter tips to prepare and dispense the mix (10, 100 und 1000 μ l)
- vortex

PRECAUTIONS

The kit 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.

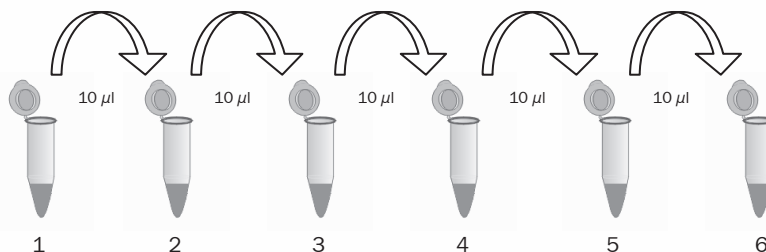
This kit does not contain hazardous or infectious substances and may be disposed of according to local regulations.

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

PROCEDURE

1. Preparation of the Dilution Series

1. Thaw *Quantification Standard* and provided *Tris Buffer*.
2. Label six 1.5 ml reaction tubes consecutively and fill each with 90 μl of *Tris Buffer*.
3. Vortex *Quantification Standard* briefly (1 to 2 seconds) at medium speed.
4. Add 10 μl of the *Quantification Standard* to reaction tube no. 1, close the tube and vortex briefly at medium speed.
5. Add 10 μl of the content of reaction tube no. 1 to reaction tube no. 2, close the tube and vortex briefly at medium speed.
6. Add 10 μl of the content of reaction tube no. 2 to reaction tube no. 3, close the tube and vortex briefly at medium speed.
7. Proceed with the following reaction tubes of the dilution series in the same way.



2. PCR

Performing DNA amplification with the use of validated PCR assays is highly recommended (eg. Minerva Bi-olabs' Venor[®]GeM-qEP *Mycoplasma* Detection Kit for qPCR, order no. 11-4025). Please follow the PCR kit manual while treating the dilutions as samples. For qPCR these samples have to be edit in the qPCR cyclor program as standards with their dedicated concentrations.

The amount of solution used as sample material defines the number of genome copies per PCR reaction:

Reaction tube no.	2 μl sample volume	5 μl sample volume	10 μl sample volume
1	2×10^5 genome copies	5×10^5 genome copies	1×10^6 genome copies
2	2×10^4 genome copies	5×10^4 genome copies	1×10^5 genome copies
3	2×10^3 genome copies	5×10^3 genome copies	1×10^4 genome copies
4	200 genome copies	500 genome copies	1000 genome copies
5	20 genome copies	50 genome copies	100 genome copies
6	2 genome copies	5 genome copies	10 genome copies

3. Evaluation

In qPCR the Ct-values should decrease linearly with ascending DNA concentration per reaction, when a suitable PCR assay is used. The software of the qPCR device calculates a standard curve and slope using the DNA concentrations stated by the user and the appendant Ct-values. Also the Ct-values of samples with unknown DNA concentrations are automatically compared to the standard curve and concentrations are assigned.

The following figures were generated using Minerva Biolabs Venor[®]GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit for qPCR and the LightCycler[®] 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) instrument.

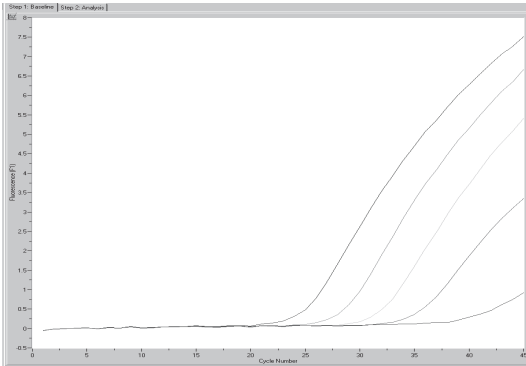


Fig. 1: Amplified dilution series of 10^4 down to 10^0 genome copies of *Mycoplasma pneumoniae* as starting template. The fluorescent channel was set to F1.

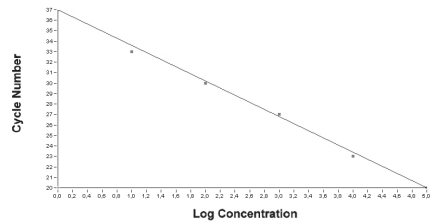


Fig. 2: Standard curve generated with the LightCycler[®] instrument using second derivative maximum method and the data from Fig. 1

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.
LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group.

Leerseite
Blank page

Leerseite
Blank page

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

Diagnostic Kits for conventional 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 Eubacteria Detection Kit	25/50/100/250 tests

Diagnostic Kits for qPCR

11-4025/100/250	Venor [®] GeM-qEP Mycoplasma ssp. 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, 1x10⁶ 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>
52-0115	<i>Mycoplasma gallisepticum</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

Extraktion 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 in dispenser box	120 wipes
15-5001	Surface Disinfectant Wipes, refill pack	5 x 120 wipes

ZellShield™

13-0050/-0150	Contamination Prevention Reagent 100x concentrate	1000 ml/ 5 x 1000 ml
---------------	---	----------------------

PCR Ultra Pure Water

55-0015/-0075	PCR Grade Water for all PCRs and RT-PCRs, cDNA synthesis sequencing and cycle sequencing	1.5 ml/ 5 x 1.5 ml
---------------	--	--------------------



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™