

Quantification Standard

Mycoplasma fermentans

genomic DNA isolate, 10⁶ genomes/ μ l, 100 μ l

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---|
| 1. Reagenzien und Materialien | 2 |
| 1.1 Inhalt der Packung | 2 |
| 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien | 2 |
| 1.3 Benötigte Geräte und Materialien | 2 |
| 2. Produktbeschreibung und Anwendungsgebiete | 2 |
| 3. Durchführung | 3 |
| 3.1 Herstellung der Verdünnungsreihe | 3 |
| 3.2 Durchführung der PCR | 3 |
| 3.3 Auswertung | 4 |

Contents

| | |
|--|---|
| 1. Reagents and Materials | 6 |
| 1.1 Components | 6 |
| 1.2 Stability and Storage | 6 |
| 1.3 Supplemental Requirements | 6 |
| 2. Application and Test Principle | 6 |
| 3. Protocol | 6 |
| 3.1 Preparation of the Dilution Series | 6 |
| 3.2 PCR | 7 |
| 3.3 Evaluation | 8 |

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

| | |
|--|-------------------|
| <i>Quantification Standard</i> | grüner Verschluss |
| genomische DNA von <i>Mycoplasma fermentans</i> in TE80 Puffer 1x10 ⁶ Genome/ μ l, 100 μ l | |
| <i>Tris Buffer</i> | weißer Verschluss |
| 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 3 x 1000 μ l | |

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der *Quantification Standard* wird bei +2 °C - +8 °C versendet und muss bei mindestens -18 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Der *Quantification Standard* kann aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist dieses Produkt entsprechend den Angaben auf der Verpackung haltbar. Ein Analysenzertifikat steht auf unserer Internetseite zur Verfügung.

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

Mikrozentrifuge
Mikroliterpipetten und Filterspitzen
Vortexer

2. Produktbeschreibung und Anwendungsgebiete

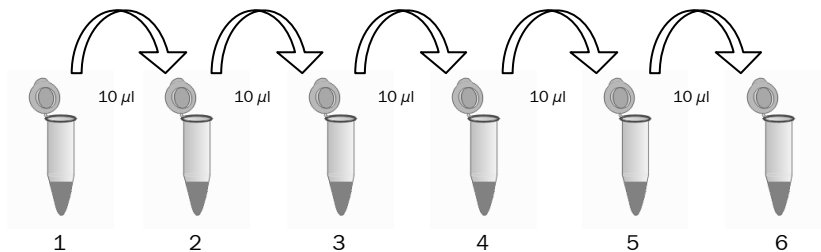
Bei diesem Produkt handelt es sich um ein Isolat genomischer DNA aus *Mycoplasma fermentans*. Zur Gewinnung der Mikroorganismen wird eine spezielle Flüssigkultur mit einem Isolat einer frühen Passage von *Mycoplasma fermentans* (*early passage strain*, NCTC 10117) beimpft und am Ende der logarithmischen 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 Gewichtsstandards) und mittels qPCR (abgeglichen gegen genau quantifizierte Calibrator-Plasmide) bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde mit klassischem TE80-Puffer eingestellt.

Genomische DNA von *Mycoplasma fermentans* dient als Amplifikations- und Sensitivitätskontrolle bei der Durchführung von DNA-Amplifikationstests mit Endpunktbestimmung (gelbasierte Auswertung). 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 *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.

3. Durchführung

3.1 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.
6. Das Reaktionsgefäß Nr. 2 wird verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
7. 10 μl des Inhalts von Reaktionsgefäß Nr. 2 werden in das Reaktionsgefäß Nr. 3 überführt.
8. Das Reaktionsgefäß Nr. 3 wird verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
9. Für die weiteren Reaktionsgefäße der Verdünnungsreihe wird in gleicher Weise verfahren.



3.2 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 |

3.3 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) generiert.

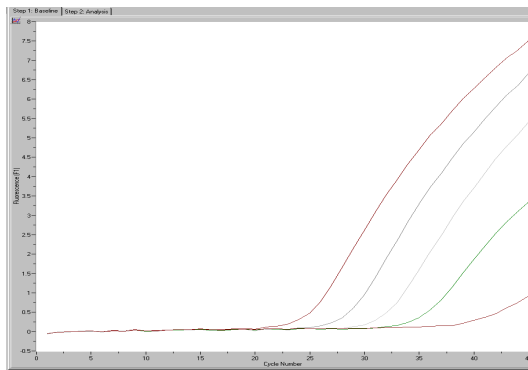


Abb. 1: Amplifikation der Verdünnungsreihe mit 10^4 bis 10^0 Genomkopien von *Mycoplasma fermentans* pro PCR-Ansatz. Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal 1.

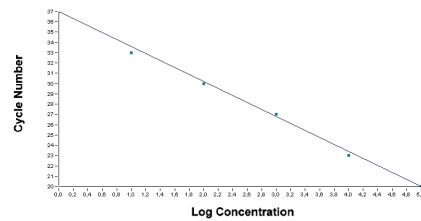


Abb. 2: Standardreihe unter Verwendung der Second Derivative Maximum - Methode des LightCycler[®] und der Daten aus Abb. 1

1. Reagents and Materials

1.1 Components

| | |
|--|-----------|
| <i>Quantification Standard</i> | green cap |
| genomic DNA of <i>Mycoplasma fermentans</i> in TE80 buffer 1x10 ⁶ genomes/μl, 100 μl | |
| <i>Tris Buffer</i> | white cap |
| Tris-HCl, pH 8.5, 3 x 1000 μl | |

1.2 Stability and Storage

The *Quantification Standard* is stable during shipping on cool packs and should be stored below –18 °C. The *Quantification Standard* should be aliquoted in order to avoid repeated freezing and thawing. By following these recommendations, the product is stable until the expiration date stated on the box label. A *Certificate of Analysis* is available from our web page.

1.3 Supplemental Requirements

microcentrifuge
micro pipettes and filter tips
vortex

2. Application

This product provides isolated genomic DNA from *Mycoplasma fermentans*. To obtain the microorganisms a special liquid culture medium was inoculated with an early passage strain of *Mycoplasma fermentans* (NCTC 10117) 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.

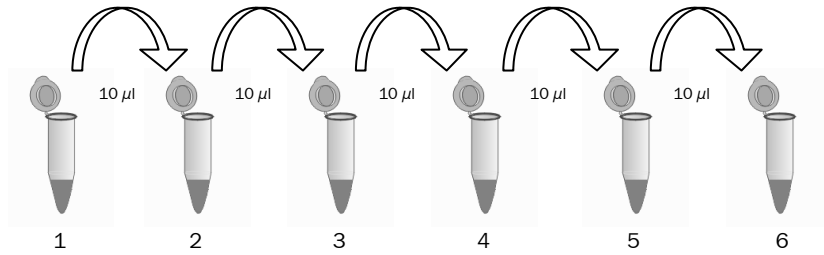
Genomic DNA of *Mycoplasma fermentans* can be used as amplification and sensitivity control of end point PCR (gel-based evaluation). For quantitative PCR the *Quantification Standard* can serve for creating standard curves by using dilutions of the material as sample in the PCR. The software of various 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.

3. Protocol

3.1 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.
6. Close the tube and vortex briefly at medium speed.
7. Add 10 μl of the content of reaction tube no. 2 to reaction tube no. 3.
8. Close the tube and vortex briefly at medium speed.
9. Proceed with the following reaction tubes of the dilution series in the same way.



3.2 PCR

Performing DNA amplification with the use of validated PCR assays is highly recommended (eg. Minerva Biolabs' Venor[®]GeM-qEP *Mycoplasma* Detection Kit for q PCR, order no. 11-4025). Please follow the PCR kit manual.

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 |

3.3 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® instrument.

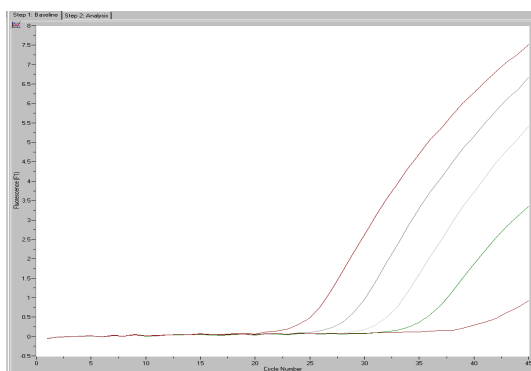


Fig. 1: Amplified dilution series of 10^4 down to 10^0 genome copies of *Mycoplasma fermentans* as starting template. The fluorescent channel was set to F1.

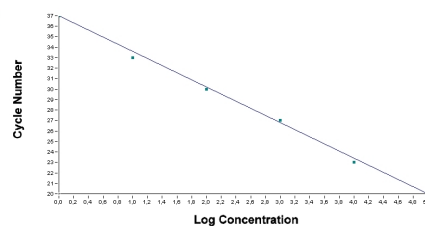


Fig. 2: Standard curve generated with the LightCycler® instrument using second derivative maximum method and the data from Fig. 1

Limited Product Warranty

This warranty limits our liability to 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.

Notice to Purchaser

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction („PCR”) covered by patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc., and F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche”). No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressly or by implication to the purchaser of this product. Minerva Biolabs does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process. Use of this product is restricted to persons that either have a license to perform PCR or are not required to obtain a license.

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

Venor is a registered trademark of Minerva Biolabs.

Related Products

Polymerases

| | | | |
|------------------------|--------------------------|----------------|-----------|
| 53-0050/0100/0200/0250 | MB TAQ DNA Polymerase | 50/100/200/250 | units |
| 54-0100/0500 | EUB Polymerase, DNA-free | | 100 units |

Diagnostic Kits for conventional PCR

| | | | |
|---------------------|---|---------------|-------|
| 11-1025/050/100/250 | Venor [®] GeM Mycoplasma Detection Kit | 25/50/100/250 | tests |
| 11-7025/050/100/250 | Venor [®] GeM Advance Mycoplasma Detection Kit | 24/48/96/240 | tests |
| 12-1025/050/100/250 | Onar [®] EUB Eubacteria Detection Kit | 25/50/100/250 | tests |

Diagnostic Kits for qPCR

| | | | |
|-----------------|--|------------|-------|
| 11-4025/100/250 | Venor [®] GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit Type 1 | 25/100/250 | tests |
| 11-5025/100/250 | Venor [®] GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit Type 2 | 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 |

Genomic DNA Extracts, +/- 10 ng/100 µl, 100 µl each

| | |
|---------|--|
| 51-1723 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> , NC 001723 |
| 51-0566 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566 |
| 51-0792 | <i>Clostridium acetobutylicum</i> , DSMZ 792 |
| 51-5571 | <i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571 |
| 51-3415 | <i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415 |
| 51-0177 | <i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177 |
| 51-0111 | <i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111 |
| 51-0112 | <i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112 |
| 51-0113 | <i>Mycoplasma salivarium</i> , NC 010113 |
| 51-0115 | <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , NC 010115 |
| 51-0116 | <i>Acholeplasma laidlawii</i> , NC 010116 |
| 51-0117 | <i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117 |
| 51-0119 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119 |
| 51-0124 | <i>Mycoplasma synoviae</i> , NC 0100124 |
| 51-0129 | <i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129 |
| 51-0130 | <i>Mycoplasma hyorhinis</i> , NC 010130 |
| 51-0162 | <i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162 |
| 51-0195 | <i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195 |

Quantification Standard, 1x10⁶ genomes/µl, 100 µl each

| | |
|---------|-------------------------------|
| 52-0112 | <i>Mycoplasma orale</i> |
| 52-0116 | <i>Acholeplasma laidlawii</i> |
| 52-0119 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| 52-0124 | <i>Mycoplasma synoviae</i> |

Mycoplasma Off[®]

| | | | |
|---------|------------------------------------|---------|----|
| 15-1000 | Surface Disinfectant Spray | 1000 | ml |
| 15-5000 | Surface Disinfectant Spray, refill | 5x 1000 | ml |

ZellShield™

| | | | |
|---------|---|----|----|
| 13-0050 | Microbial Contamination Preventive Reagent for Cell Cultures, 100x solution | 50 | ml |
|---------|---|----|----|

DNA Remover™

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