

**Onar®Tp**  
**Treponema pallidum Diagnosis Kit for qPCR**  
**-Instructions for Use-**

**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. Anwendungsgebiete und Testprinzip	3
3. Durchführung	3
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	3
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	4
3.3 Programmierung und Auswertung	4
3.3.1 LightCycler® 1.0, 1.2, 1.5 oder 2.0	4
3.3.2 Rotorgene 6000	6
3.3.3 ABI 7500	7
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	8
4. Interpretation der Ergebnisse	8

**Contents**

1. Reagents and Material	9
1.1 Test Kit Components	10
1.2 Stability and Storage	10
1.3 Supplemental Requirements	10
2. Application and Test Principle	10
3. Test Protocol	10
3.1 Preparation of Sample Material	10
3.2 Rehydration of the Reagents	10
3.3 Experimental Protocol and Evaluation	11
3.3.1 LightCycler® 1.0, 1.2, 1.5 or 2.0	11
3.3.2 Rotorgene 6000	12
3.3.3 ABI 7500	13
3.4 The PCR Master Mix	14
4. Result Interpretation	14

# 1. Reagenzien und Materialien

## 1.1 Inhalt der Packung

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix)</i>	roter Verschluss
Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert	
<i>Rehydration Buffer</i>	blauer Verschluss
1,8 ml	
<i>Positive Control DNA</i>	grüner Verschluss
DNA-Fragmente des Genoms von <i>Treponema pallidum</i> , mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert	
<i>Internal Control DNA</i>	gelber Verschluss
Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert	
<i>PCR grade Water</i>	weißer Verschluss
2 ml	

## 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* ist lichtgeschützt aufzubewahren. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien sollte vermieden werden. Werden regelmäßig wenige Proben getestet, sollten die Kontrollen nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat (das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite) angegebenen Datum haltbar.

## 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

Real time PCR-Geräte mit FAM und ROX-Filter  
geeignete PCR-Reaktionsgefäße bzw. Kapillaren  
Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen  
deionisiertes, DNA-freies Wasser  
DNA-Polymerase (1 Unit/Test)



**Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB Taq DNA-Polymerase (Cat # 53-0050 oder Cat # 53-1050). Bei der Verwendung anderer Polymerasen mit unserem Kit können wir weder hohe Sensitivität noch Kompatibilität garantieren. Sollten Sie unsere MB Taq DNA-Polymerase im Vergleich mit Ihrer eigenen Polymerase testen wollen, fordern Sie bitte ein kostenfreies Testmuster an. Es kann bei der Verwendung anderer Polymerasen notwendig sein den mit der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer zu verwenden.**

## 2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Onar<sup>®</sup>Tp ist eine *in vitro* Testsystem zur qualitativen und quantitativen Diagnostik des Erregers der Syphilis in klinischen Proben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für das *poIA*-Gen von *Treponema pallidum* spezifisch. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei 520 nm die Bildung des Produktes anzeigt.

Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Kontrolle, welche im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert in einer erfolgreichen PCR ein Produkt, das mit einer weiteren sequenzspezifischen Sonde bei 600 nm detektiert wird. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden.

Der direkte Nachweis von *Treponema pallidum* ist innerhalb von 2-3 Stunden möglich. Dieser Testkit wurde unter dem Aspekt einer hohen Praktikabilität und einer einfachen Handhabung konzipiert. Dadurch wird eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Tests ermöglicht.

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Durch die Verwendung des hitzestabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz kann ein Verschleppen früherer PCR-Produkte in den neuen Reaktionsansatz vermieden werden. Dazu muss in vorangegangenen PCR-Ansätzen dTTP gegen dUTP ausgetauscht worden sein und eine Behandlung der neuen Ansätze mit UNG erfolgen. Dabei werden unerwünschte PCR-Vorlagen an den UTPs gespalten und im anschließenden Denaturierungsschritt hydrolysiert. Gleichzeitig wird das Enzym durch die Hitze inaktiviert. Native DNA wird nicht abgebaut, da es kein Uracil enthält. UNG ist nicht Bestandteil von Onar<sup>®</sup>Tp.

## 3. Durchführung

### 3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Als Untersuchungsmaterialien eignen sich Abstrichproben einer indolenten Ulzeration mit derben Rand (*Ulcus durum*, sog. „Primäraffekt“) an einer Inokulationsstelle. Zur Entnahme der Proben sollten sterile, trockene Tupfer ohne Medium verwendet werden. Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit empfehlenswert, um Inhibitoren der PCR sicher zu entfernen und eine Konzentrierung der *Treponema pallidum*-DNA zu erreichen (DNA Extraction Kit Cat # 56-1100). Der enthaltene DNA-Extrakt kann direkt für den Onar<sup>®</sup>Tp eingesetzt werden. Die Probe sollte eine Gesamt-DNA-Last von maximal 100 µg/ml nicht überschreiten. Eine Lagerung der Extrakte bei mindestens -18 °C über einen Zeitraum von einem Jahr ist möglich. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder eine Lagerung im Kühlschrank für mehr als 12 Stunden sollte vermieden 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.

### 3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung in der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365  $\mu\text{l}$  *Rehydration Buffer* zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  *PCR grade Water* zur *Internal Control DNA* und zur *Positive Control DNA*
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Anschließend kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren



**Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien bei mindestens -18 °C gelagert werden.**

### 3.3 Programmierung und Auswertung

#### 3.3.1 LightCycler® 1.0, 1.2, 1.5 oder 2.0

##### Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
Zieltemperatur [°C]	95
Inkubationszeit [min]	2:00
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None



**Die Dauer der Vorinkubation bei 95°C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.**



##### **LightCycler® 2.0:**

**Bitte achten Sie bei der Programmierung auf die Einstellung der „Seek Temperature“, diese sollte auf mindestens 90 °C eingestellt sein.**

##### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45  
Analysemodus Quantifikation

<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>	<b>Segment 2</b>	<b>Segment 3</b>	<b>Segment 4</b>
Zieltemperatur [°C]	95	55	60	72
Inkubationszeit [s]	0	5	7	5
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0	0	0	0
Temperaturschritte [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0	0	0	0
Fluoreszenzmessung	None	None	Single	None



**Segment 3 darf nicht weggelassen werden!**

### Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
Zieltemperatur [°C]	40
Inkubationszeit [s]	30
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

#### **Auswertung der Rohdaten:**

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3.
- Zu Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

Target	<b><i>Tp</i></b>	<b>Interne Kontrolle</b>
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)

### 3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min



**Die Dauer der Vorinkubation bei 95 °C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.**

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Einstellung	Cycling
Zyklen	45
Denaturierung	95 °C für 5 sek
Annealing	55 °C für 10 sek —> <b>Datenerfassung (Filter Green und Orange)</b>
Extension	72°C für 7 sek
Gain	automatisch (auto Gain)
Slope Correct	aktiviert
Ignore First	deaktiviert



**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl:  
Target: Green (470-510 nm)  
Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)**

#### **Auswertung der Rohdaten:**

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:
  - Quantitation Analysis - Cycling A* (green oder orange)
  - Quant. Results - Cycling A* (green oder orange)
  - Standard Curve - Cycling A* (green oder orange)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *linear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold (entfällt wenn eine Standardreihe mitgeführt und *Autothreshold* angewählt wurde)
  - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
  - Thresholdlinie in Grafik platzieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

Target	<i>Tp</i>	Interne Kontrolle
Kanal	Green	Orange



**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl!**

**Target: FAM**

**Interne Kontrolle: VIC**

**Quencher: none**

**Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein. Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden. Fluoreszenzmessung während der Extension.**

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung                    Hold  
Zieltemperatur                95 °C  
Inkubationszeit               3:00 min

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen                         45  
Einstellung                    Cycle  
Denaturierung                95 °C für 30 sek  
Annealing                     55 °C für 30 sek  
Extension                      60 °C für 45 sek

#### **Auswertung der Rohdaten:**

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:

Data:            Delta RN vs. Cycle  
Detector:       FAM und VIC  
Line Color:     Well Color

Target	<i>Tp</i>	Interne Kontrolle
Kanal	FAM	VIC

- Mit der rechten Maustaste öffnet sich ein neues Fenster, dort erfolgt die Einstellung der *Graph settings*  
Folgende Einstellungen sollten dort angewählt und im Anschluß mit *ok* bestätigt werden:  
Real Time Settings:            Linear  
Y-Axis Post Run Settings:     Linear und Auto Scale  
X-Axis Post Run Settings:     Auto Scale  
Display Options:                2
- Zur Berechnung der *ct*-Werte und deren Darstellung im Report bitte auf *Analyze* klicken.  
Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle

### 3.4 Ansatz des Mastermixes

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25  $\mu\text{l}$ . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden. Der Mastermix wird in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen*
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 $\mu\text{l}$	350,0 $\mu\text{l}$
Internal Control DNA	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
MB DNA Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
gesamt	16,0 $\mu\text{l}$	

\*entspricht dem Inhalt eines *Primer/Probe/Nucleotide Mix*-Röhrchens



**Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.**

Der Mastermix wird á 15  $\mu\text{l}$  auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Der Überschuss (1  $\mu\text{l}$ ) an Mastermix wird verworfen. Den einzelnen PCR-Gefäßen wird entweder als Negativkontrolle 10  $\mu\text{l}$  PCR-Wasser oder der Elutionspuffer der DNA-Extraktion bzw. 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. 10  $\mu\text{l}$  Positivkontrolle hinzugefügt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

### 4. Interpretation der Ergebnisse

Die Präsenz von *Treponema pallidum* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im FAM-Kanal angezeigt. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an *Treponema* in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das FAM-Signal erkennbar.

<i>Tp</i> PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>Treponema pallidum</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	<i>Treponema pallidum</i> negativ

## 1. Reagents and Materials

### 1.1 Test Kit Components

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)</i>	red cap
Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized	
<i>Rehydration Buffer</i>	blue cap
1.8 ml	
<i>Positive Control DNA</i>	green cap
Fragment of <i>Treponema trachomatis</i> DNA, non-infectious, lyophilized	
<i>Internal Control DNA</i>	yellow cap
Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized	
<i>PCR grade Water</i>	white cap
2 ml	

### 1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2 °C to +8 °C. After rehydration of the *Primer/Probe/Nucleotide Mix*, the *Positive Control DNA* and the *Internal Control DNA*, store below -18 °C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* from light. For repeated testing of low sample numbers, controls should be aliquoted after rehydration. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the box label or the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our website).

### 1.3 Supplemental Requirements

- real-time machine suitable with ROX and FAM dyes
- glass capillaries or PCR reaction tubes
- microcentrifuge, micropipettes and filtered tips
- deionized, DNA-free water
- polymerase (1 U/reaction)



**The test provides excellent results with MB Taq DNA-Polymerase (Cat # 53-0050 or 53-1050). We can neither guarantee a high level of sensitivity nor compatibility with other polymerases. If you intend to test our MB Taq DNA-Polymerase in parallel with your in-house polymerase, please feel free to contact us and get a gratis sample. However, if you want to use your own polymerase, it may be necessary to use the specific buffer provided with this polymerase.**

## 2. Application and Test Principle

Onar<sup>®</sup>Tp is an *in vitro* test for quantitative and rapid real time PCR-based diagnostics of *Treponema pallidum* (Syphilis) in clinical samples. The primer set and probe are specific for a segment of the *poIA* gene. The target probe emits fluorescent light at 520 nm. The detection procedure can be performed within 2 to 3 hours.

Onar<sup>®</sup>Tp also provides internal control DNA, which can be added to the reaction. When running the PCR with the internal control DNA, a successful performed reaction with a negative result is indicated by a distinct fluorescent signal. The internal control is detected by another probe, which emits light at 600 nm. The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable to prevent carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplified reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. The UNG cleaves DNA at any site where a deoxyuridylate residue has been incorporated. Subsequently, the resulting abasic sites are hydrolyzed due to the high temperature during the initial denaturation step and cannot serve as PCR templates any longer. The heat-labile UNG is inactivated at the same time. Native DNA (e.g., the template DNA) does not contain Uracil and therefore it is not degraded by this procedure. UNG is not provided with Onar<sup>®</sup>Tp.

## 3. Test Protocol

### 3.1 Preparation of Sample Material

Clinical samples should be extracted from infected patients. Primarily swabs must be taken from the infected lesions of a skin ulceration ("*Ulcus durum*") or samples from the genital tract (e.g. vaginal or rectum). The swabs should be sterile and without medium (e.g. Darcan<sup>®</sup>). It is necessary that templates for PCR analysis are prepared by DNA extraction using a DNA extraction kit (MB Swab DNA Extraction Kit Cat No 56-1100). 2 µl of the DNA extract can be used directly as PCR template. The extracts can be stored at a temperature of below -18°C for a period of one year. Repeated freezing and thawing or storage in the refrigerator for more than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100 µg/ml DNA. To avoid false positive results, we recommend the use of deionized DNA-free Water (e.g Cat. No. 55-0015, PCR Ultra Pure Water) and aerosol-preventive filter tips and gloves.

### 3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 µl *Rehydration Buffer* to the *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
4. add 300 µl of *PCR grade Water* to the *Internal Control DNA* and *Positive Control DNA*
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again

### 3.3 Experimental Protocols and Result Reading

#### 3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0

##### Program 1: Pre-incubation

Cycles 1  
 Analysis Mode None

##### **Temperature Targets [°C] Segment 1**

Target Temperature [°C] 95  
 Incubation time [min] 2:00  
 Temperature Transition Rate [°C/s] 20.0  
 Secondary Target Temperature [°C] 0  
 Step Size [°C] 0.0  
 Step Delay [Cycles] 0  
 Acquisition Mode None



##### **LightCycler® 2.0:**

**Please check the correct settings for the „seek temperature“, this should be adjusted on at least 90 °C.**

##### Program 2: Amplification

Cycles 45  
 Analysis Mode Quantification

<b>Temperature Targets [°C]</b>	<b>Segment 1</b>	<b>Segment 2</b>	<b>Segment 3</b>	<b>Segment 4</b>
Target Temperature [°C]	95	55	60	72
Incubation time [s]	0	5	7	5
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0	0
Step Size [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Step Delay [Cycles]	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None



**Segment 3 is essential for the performance of the kit. Do not skip or modify this step.**

##### Program 3: Cooling

Cycles 1  
 Analysis Mode None

##### **Temperature Targets [°C] Segment 1**

Target Temperature [°C] 40  
 Incubation time [s] 30  
 Temperature Transition Rate [°C/s] 20.0  
 Secondary Target Temperature [°C] 0  
 Step Size [°C] 0.0  
 Step Delay [Cycles] 0  
 Acquisition Mode None

### Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and Channel 3 at the LC 2.0
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific *ct*-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

target	<i>Treponema</i>	Internal control
channel for LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
channel for LC 2.0	channel 1 (530)	channel 3 (610)

### 3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)

#### Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Hold Temperature	95 °C
Hold Time	3 min 0 sec

#### Program Step 2: Amplification

Setting	Cycling
Cycles	45
Denaturation	95°C for 5 sec
Annealing	55°C for 10 sec —> <b>acquiring to Cycling A (green and orange)</b>
Elongation	72°C for 7 sec
Gain setting	automatic (auto Gain)
Slope Correct	activated
Ignore First	deactivated

### Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green or orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:

*Quantitation Analysis - Cycling A (green or orange)*

*Quant. Results - Cycling A (green or orange)*

*Standard Curve - Cycling A (green or orange)*

- In window *Quantitation Analysis*, select first *inear scale* and than *slope correct*

Threshold setup (not applicable if a standard curve was carried with the samples and auto threshold was selected)

- In window *CT Calculation* set the threshold value to 0-1

- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.

- The *ct*-values can be taken from the window *Quant. Results*.
- Samples showing no *ct*-value can be considered as negative.

target	<i>Treponema</i>	Internal control
channel	green	orange

Program Step 1: Pre-incubation

Setting Hold  
 Temperature 95 °C  
 Incubation time 3:00 min

Program Step 2: Amplification

Cycles 45  
 Setting Cycle  
 Denaturing 95 °C für 30 sek  
 Annealing 55 °C für 30 sek  
 Extension 60 °C für 45 sek



**Please check the correct settings of the detectors!**

**target probe: FAM**  
**internal control: VIC**  
**quencher: none**

**The ROX Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well. Measurement of fluorescence during extension.**

Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:

Data: Delta RN vs. Cycle  
 Detector: FAM and VIC  
 Line Color: Well Color

target	<b>Treponema</b>	<b>Internal control</b>
channel	FAM	VIC

- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button.

Select the following setting and confirm with *ok*:

Real Time Settings: Linear  
 Y-Axis Post Run Settings: Linear and Auto Scale  
 X-Axis Post Run Settings: Auto Scale  
 Display Options: 2

- Initiate the calculation of the ct-values and the graph generation by clicking on *Analyze* within the report window.
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

### 3.4 The PCR Master Mix

Total volume per reaction is 25  $\mu$ l. When setting up reactions, calculations should also include positive (PC) and negative controls (NC). Pipette master mix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

	for 1 reaction	for 25 reactions*
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 $\mu$ l	350,0 $\mu$ l
Internal Control DNA	1,0 $\mu$ l	25,0 $\mu$ l
MB DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l	25,0 $\mu$ l
total	16,0 $\mu$ l	

\* the equivalent of the content of one red-capped vial



**The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 45 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.**

Aliquot 15  $\mu$ l of master mix into each PCR reaction tube. Discard the excess of master mix (1  $\mu$ l).

Pipette 10  $\mu$ l of sample elution buffer or DNA-free water per tube as negative control. Seal the tubes. Add 10  $\mu$ l of sample per PCR reaction tube. Sealed these tubes as well before proceeding with the positive controls or standards. Add 10  $\mu$ l of the positive control to the remaining tubes as the last step in order to avoid cross contamination.

### 4. Result Interpretation

The presence of *Treponema pallidum* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the FAM channel during PCR. The concentration of the contaminant can be calculated by a software comparing the crossing cycle number of the sample with a standard curve created in the same run.

A successfully performed PCR without inhibition is indicated by an increasing fluorescence signal in the internal control channel, provided the Internal Control was added to the master mix. *Treponema* DNA and Internal Control DNA are competitors in PCR. Because of the very low concentration of Internal Control in the PCR mix, the signal strength in this channel is reduced with increasing *Treponema* DNA loads in the sample.

<b>Treponema PCR</b>	<b>Internal Control</b>	<b>Interpretation</b>
positive	irrelevant	<i>Treponema pallidum</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>Treponema pallidum</i> negative

## **Appendix**

### *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.

### *§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.

### *Limited License*

The use of this product for the detection of mycoplasma is covered by a Scorpions license from DxS Ltd. Further information on Scorpions licenses can be obtained from DxS Ltd, 48 Grafton St, Manchester, UK M13 9XX.

### *Trademarks*

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group. ABI Prism is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Venor and Onar are registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH.

## Related Products

### MB Taq DNA Polymerase

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

### Clinical Diagnostic Kits for qPCR

20-2025/-2100/-2250	Venor <sup>®</sup> Mp-QP <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
21-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ls-QP <i>Legionella</i> species	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar <sup>®</sup> Lp-QP <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
22-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> MRSA Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar <sup>®</sup> Tp <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

### Quantification Standards, 100 $\mu$ l each, 1x10<sup>6</sup> genomes/ $\mu$ l

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard

### Genomic DNA Extracts, 100 $\mu$ l each, +/- 10 ng / 100 $\mu$ l

51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
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
51-0117	<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<sup>™</sup>

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
---------	-----------------------	-----------------