

Venor®GeM-qEP
***Mycoplasma* Detection Kit for qPCR**
- Type 2 -

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
2.1 Spezifität	3
2.2 Sensitivität	4
3. Durchführung	4
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	4
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	6
3.3 Programmierung und Auswertung	6
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes	7
3.5 Interpretation der Ergebnisse	8
4. Fehleranalyse	8
5. Gerätekompatibilität	8

Contents

1. Reagents and Materials	9
1.1 Test Kit Components	9
1.2 Stability and Storage	9
1.3 Supplemental Requirements	9
2. Application and Test Principle	10
2.1 Specificity	10
2.2 Sensitivity	11
3. Test Protocol	11
3.1 Preparation of Sample Material	11
3.2 Rehydration of the Reagents	12
3.3 Experimental Protocols and Result Reading	13
3.4 PCR Master Mix Setup	14
3.5 Result Interpretation	14
4. Trouble Shooting	15
5. Instrument Compatibility	15

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Primer/Probe/Nucleotide Mix Mycoplasma spp.

Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

roter Verschluss

REAC	B
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix Mycoplasma pneumoniae

Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

weißer Verschluss

REAC	G
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix Acholeplasma laidlawii

Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

schwarzer Verschluss

REAC	F
------	---

Rehydration Buffer

Rehydratisierungspuffer, 1,8 ml

blauer Verschluss

REAC	A
------	---

Positive Control DNA

DNA-Fragmente des *M. orale*, *A. laidlawii* und *M. pneumoniae*-Genoms,
mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert

grüner Verschluss

CONTROL	+
---------	---

Internal Control DNA

Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert

gelber Verschluss

CONTROL	i
---------	---

PCR grade Water

Wasser zur Rehydratisierung der Komponenten
und zur Herstellung des Mastermixes

weißer Verschluss

REAC	H
------	---

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden gekühlt versendet und bei +2°C - +8°C aufbewahrt. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien nach Resuspension sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und die *Primer/Probe/Nucleotide Mixe* nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat angegebenen Datum haltbar. Das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite (www.minerva-biolabs.com).

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät (Kompatibilität siehe Seite 8)
- geeignete PCR Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000µl)
- MB Taq DNA Polymerase (1 Unit/Test)



Dieser Kit wurde mit unserer MB Taq DNA Polymerase validiert und erzielt mit ihr exzellente Ergebnisse (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250).

Hinweis:

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 MB Taq Testmuster (10 Units) an. Bei der Verwendung anderer Polymerasen muss eventuell, der Polymerase spezifische Reaktionspuffer verwendet.

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Der Venor®GeM-qEP Mykoplasmen-Detektionskit ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Die qPCR-Methode erlaubt eine sehr schnelle und online verfolgbare Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Der Test wurde in Anlehnung an die „European Pharmacopoeia“ mit unterschiedlichem Probenmaterial (Chondrozytenpräparate, Seren, Überstände permanente Zellkulturen, usw.) validiert. Dabei wurde das in der European Pharmacopoeia 2.6.7 Suppl. 5.8 beschriebene Direktnachweis- und Anreicherungsverfahren auf Zellkulturen angewendet. Der Kit enthält drei verschiedene Primer/Probe/Nucleotide Mixe mit FAM-markierten Scorpion-Sonden unterschiedlicher Spezifität. Der *Mycoplasma spp.* Mix detektiert verschiedene Mykoplasmen (siehe Tabelle), der *Mycoplasma pneumoniae* Mix detektiert *Mycoplasma pneumoniae* und der *Acholeplasma laidlawii* Mix ist spezifisch für *Acholeplasma laidlawii*. Zur Analyse einer Probe werden drei verschiedene Mastermixe hergestellt.



Ein Mastermix enthält nur einen der drei Primer/Probe/Nucleotide Mixe. Die Mixe dürfen nicht gemischt werden, da dies zu Sensitivitätsverlusten der PCR führt.

Das Testsystem beinhaltet eine Interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt wird. Diese wird bei einer erfolgreich durchgeführten PCR mit einer weiteren spezifischen Sonde detektiert. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse z.B. durch Inhibition der PCR durch die Probenmatrix ausgeschlossen werden.

Der Primer/Probe/Nucleotide Mix enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Eine Vorbehandlung der Ansätze mit Uracil-N-Glycosylase (UNG) ist generell möglich. UNG ist nicht Bestandteil von Venor®GeM-qEP.

2.1 Spezifität

Kreuzreaktionen mit den in der „European Pharmacopoeia“ angegebenen Bakterien mit enger phylogenetischer Verwandtschaft zu Mykoplasmen (*Clostridium*, *Bacillus* und *Streptococcus*) liegen nicht vor. Bei der Verwendung von *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus acidophilus* und *Streptococcus pneumoniae*-DNA als Probenmaterial werden keine Fluoreszenzsignale generiert. Auch humane DNA, murine DNA und weitere bakterielle DNA (*Legionella sp.*, *Chlamydomphila sp.*, *Bordetella sp.* etc.) werden nicht detektiert. In der folgenden Tabelle sind die detektierbaren Spezies aufgelistet.

Detektierbare Spezies:

<i>A. laidlawii</i> *	<i>M. cloacale</i>	<i>M. glycyphilum</i>	<i>M. pneumoniae</i> *
<i>M. agalactiae</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. pulmonis</i>
<i>M. agassizii</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. salivarium</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. simbae</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. sp.ovine/caprine</i>
<i>M. arginini</i>	<i>M. cricetuli</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. spermatophilum</i>
<i>M. arthritidis</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sualvi</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. faucium</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. synoviae</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. canadense</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. timone</i>
<i>M. capricolum</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. turnidae</i>
<i>M. caviae</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. verecundum</i>
<i>M. citelli</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. opalescens</i>	<i>M. zalophi</i>
	<i>M. gateae</i>	<i>M. orale</i>	

*Detektion mit dem entsprechenden *Primer/Probe/Nucleotide Mix*

2.2 Sensitivität

Der positive Cut-Off point (Genomkopien/PCR) wurde für die drei Sonden anhand von verschiedenen Spezies bestimmt:

Mycoplasma spp. Mix: 12,5 GK/PCR für *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, ect.

A. laidlawii Mix: 8 GK/PCR für *A. laidlawii*

M. pneumoniae Mix: 50 GK/PCR für *M. pneumoniae*

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Zellkulturen sollten bei 90 bis 100 % Konfluenz getestet werden. Bei Kulturen, die sich in der Endphase der Proliferation befinden, kann es zur Anreicherung von Inhibitoren der PCR im Kulturmedium kommen. Diese Inhibition wird durch die internen Kontrolle bei der Analyse der PCR angezeigt. Gegebenenfalls ist dann eine DNA-Extraktion durchzuführen (s.u.). Im Zellkulturmedium enthaltenes Penicillin und Streptomycin haben keinen Einfluss auf das Wachstum von Mykoplasmen oder die Sensitivität des Tests. Zellkulturüberstände sind für die Testung besonders gut geeignet. Zellmaterial sollte nicht in die Probe eingebracht sondern die DNA daraus grundsätzlich extrahiert werden. Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca. 10^6 bis max. 10^8 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 Probe wird durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen werden lysiert und DNA sen inaktiviert.

Inhibierte Proben (Zellkulturüberstände) wie auch Zellen, Gewebeextrakte, Cryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte können nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden. Dazu empfehlen wir eine DNA-Extraktion mit unserem DNA-Extraktionskit (MB DNA Extraction Kit Cat # 56-1100). Inhibitoren der PCR werden so sicher entfernt und die Mykoplasmen-DNA wird konzentriert. Bitte achten sie darauf, vor Elution der Probe jeglichen alkoholhaltigen Waschpuffer zu entfernen, da bei Vorhandensein von Restalkohol in der Probe die PCR weniger effektiv oder inhibiert sein kann. Desweiteren können durch Extraktion Farbstoffe aus dem Probenmaterial entfernt werden. Farbstoffe wie Phenolrot (unsere Analysen zeigten keine Veränderung der Fluoreszenzmessung mit Standard-Phenolrotkonzentrationen im Zellkulturüberstand bei einem Probenvolumen von 2 µl) können die Fluoreszenzmessung beeinflussen. 2 µl des erhaltenen DNA-Extraktes werden direkt für die PCR eingesetzt.

Folgende Verfahren der Probenvorbereitung können alternativ angewendet werden:

Hitzeinaktivierung der Proben

1. 100 µl Probenmaterial, z.B. Zellkulturüberstand, in DNA freies Reaktionsgefäß geben, dicht verschließen
2. 10 min kochen (bzw. bei 95 °C inkubieren), Vorsicht: Deckel kann sich öffnen und Aerosole können entstehen
3. Zur Entfernung von Zellfragmenten kurz zentrifugieren (5 sek, 1000 x g)
4. Der Überstand wird direkt in die PCR eingesetzt. Alternativ kann ein kommerziell erhältlicher DNA Extraktionskit (z.B. MB DNA Extraktionskit Cat # 56-1100) verwendet werden.

Anreicherung von Mykoplasmen durch Zentrifugation

1. 1 ml Zellkulturüberstand in ein DNA-freies Reaktionsgefäß geben, dicht verschließen
2. Zentrifugation für 15 min bei mindestens 10.000 x g oder 6 min bei 13.000 x g
3. Überstand abnehmen, Restflüssigkeit im Gefäß stehen lassen
4. 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,4) hinzugeben
5. Probe vortexen und für 10 min bei 95 °C inkubieren

Die gewonnene Extrakte können bei <-18 °C mindestens ein Jahr gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden, ebenso Lagerung bei +2 °C bis +8 °C für mehr als 12 Stunden. Die DNA-Konzentration der Proben sollte 100 µg/ml nicht überschreiten.

3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl Rehydratisierungspuffer zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von DNA-freiem Wasser (im Kit enthalten)
Positive Control DNA 300 µl
Internal Control DNA 300 µl
3. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

3.3 Programmierung und Auswertung

für ABI 7500

Detektoreinstellungen:

für die *Mycoplasmen* Target-Sonde:

Reporter - FAM Quencher - none

für die Interne Kontroll-Sonde:

Reporter - 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

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

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
- 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 PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25 μl . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden.

Pipettierschema:

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
Wasser (weißer Deckel)	8,0 μl	200,0 μl
Primer/Probe/Nucleotide Mix*	14,0 μl	350,0 μl
Internal Control DNA (gelber Deckel)	1,0 μl	25,0 μl
Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl	5,0 μl

+ Template DNA/ NK oder PK 2,0 μl

*(roter, weißer oder schwarzer Deckel)



Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 60 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.

Der Mastermix wird á 23 μl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 2 μl deionisiertem Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 2 μl Probe oder 2 μl Positivkontrolle versetzt. 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.

3.5 Interpretation der Ergebnisse

Mycoplasmen PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>Mycoplasmen</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negative	positiv	<i>Mycoplasmen</i> negativ

Die Präsenz von *Mycoplasmen* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals für *Mycoplasmen* 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 *Mycoplasmen* in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Kanal für *Mycoplasmen* erkennbar.

4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie das Pipettierschema überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Bei Verwendung anderer DNA-Polymerasen als der empfohlenen sind die unter Punkt 1 aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Polymerase-Konzentration kann dabei auf bis zu 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich das gesamte Pipettierschema verändert.

Findet bei den Kontrollansätzen keine Amplifikation statt, kann dies folgende Ursachen haben:

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend oder Enzym nicht kompatibel mit Kitpuffer
- Programmierfehler
- Pipettierfehler
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

5. Gerätekompatibilität

Gerät	Typ 1	Typ 2
LightCycler® 1.2	+v	-
LightCycler® 1.5	+	-
LightCycler® 2.0	+	o
LightCycler® 480	+	o
Rotorgene 3000	+	o
Rotorgene 6000 (5-plex)	+v	o
ABI Prism® 7000	-	+
ABI Prism® 7300	-	+
ABI Prism® 7500	-	+v
ABI Prism® 7700	-	+
ABI Prism® 7900	-	+
iCycler iQ®	o	o
iQ™5	+	o
Opticon 2	-	o
Chromo 4	o	o
MX3000P	o	o
MX4000	o	o

+ = empfehlende Kit-Variante

- = Detektion der internen Kontrolle nicht möglich

o = nicht getestet, aber Kompatibilität zu erwarten

v = validiert

1. Reagents and Materials

1.1 Test Kit Components

Instruction manual

Primer/Probe/Nucleotide Mix Mycoplasma spp.

primers, probe and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

red cap

REAC	B
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix Mycoplasma pneumoniae

primers, probe and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

white cap

REAC	G
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix Acholeplasma laidlawii

primers, probe and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

black cap

REAC	F
------	---

Rehydration Buffer

1.8 ml

blue cap

REAC	A
------	---

Positive Control DNA

DNA-fragments of *M. orale*, *A. laidlawii* and *M. pneumoniae* prepared by PCR, non-infectious, lyophilized

green cap

CONTROL	+
---------	---

Internal Control DNA

Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized

yellow cap

CONTROL	i
---------	---

PCR Grade Water

water for resolving the components and setting up the mastermix

white cap

REAC	H
------	---

1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping and should be stored at +2°C to +8°C. After rehydration of the *Primer/Probe/Nucleotide Mixes*, the *Positive Control* and the *Internal Control*, store below -18°C and avoid repeated freezing and thawing. For repeated testing of low sample numbers, *Primer/Probe/Nucleotide Mixes* and controls should be aliquoted after rehydration. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our website: www.minerva-biolabs.com).

1.3 Supplemental Requirements

- qPCR machine (to compatibility check table on page 17)
- corresponding PCR reaction tubes
- micro centrifuge, micropipettes and filtered tips (1 - 1000 µl)
- MB *Taq* DNA Polymerase (1 unit/test)



The test was validated with MB Taq DNA-Polymerase and we get excellent results (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250).

Note: 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 MB Taq sample (10 units). 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

Venor®GeM-qEP utilizes the polymerase chain reaction (PCR), which was established as the method of choice for high sensitivity in the detection of *Mycoplasma* contamination in cell cultures and other cell culture derived biologicals. The kit was validated according to the "European Pharmacopoeia" with different kind of sample material (chondrocytes, serum, cell culture supernatant, ect.). The test has been validated for both methods described in the European Pharmacopoeia 2.6.7: direct detection and cell-culture enrichment followed by PCR. The kit includes three different Primer/Probe/Nucleotide mixes. These mixes contain FAM labeled Scorpion-probes specific for different *mycoplasma*. The *Mycoplasma spp.* mix detects a broad range of *Mycoplasma* (see detailed list), the *M. pneumonia* Primer/Probe/Nucleotide mix detects *M. pneumoniae* and the third mix is specific for *Acholeplasma laidlawii*.



For the analysis of one sample three master mixes have to be set up. Do not blend the three Primer/Probe/Nucleotide mixes as this will result in a decreased sensitivity of the PCR.

Venor®GeM-qEP also provides an internal control, which can be added to the reaction. When running the PCR with the internal control, a successfully performed reaction is indicated by a distinct fluorescent signal. It might be reduced or absent for samples with high *Mycoplasma* contamination. If there is no signal for *Mycoplasma* amplification nor for internal control amplification the sample matrix might have inhibited the PCR and a DNA extraction should be performed.

Venor®GeM-qEP contains the nucleotide dUTP instead of dTTP to allow an UNG treatment. 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. UNG is not provided with Venor®GeM-qEP.

2.1 Specificity

Cross-detection of bacteria with close phylogenetic relation to *Mycoplasma* is not monitored. The „European Pharmacopoeia“ recommends to check for unspecific detection of *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus*. None of the following species is detected with the Venor®GeM-qEP detection kit: *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus pneumoniae*. Furthermore there is no positive signal with human, murine or other bacterial DNA (e.g.: *Legionella sp.*, *Chlamydomphila sp.*, *Bordetella sp.*) as template. The following list shows the *Mycoplasma* detectable with Venor®GeM-qEP.

Detectable species:

<i>A. laidlawii</i> *	<i>M. cloacale</i>	<i>M. glycyphilum</i>	<i>M. pneumoniae</i> *
<i>M. agalactiae</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. pulmonis</i>
<i>M. agassizii</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. salivarium</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. simbae</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. sp.ovine/caprine</i>
<i>M. arginini</i>	<i>M. cricetuli</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. spermatophilum</i>
<i>M. arthritidis</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. suaui</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. faucium</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. synoviae</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. timone</i>
<i>M. canadense</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. turnidae</i>
<i>M. capricolum</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. verecundum</i>
<i>M. caviae</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. opalescens</i>	<i>M. zalophi</i>
<i>M. citelli</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. orale</i>	

*Detection with *A. laidlawii* Primer/Probe/Nucleotide mix respectively *M. pneumoniae* Primer/Probe/Nucleotide mix

2.2 Sensitivity

The positive Cut-Off point (genome copies/PCR) was determined for the three Primer/Probe/Nucleotide mixes by using different mycoplasma species as template:

Mycoplasma spp. mix: 12,5 GC/PCR for *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*

A. laidlawii mix: 8 GC/PCR for *A. laidlawii*

M. pneumoniae mix: 50 GC/PCR for *M. pneumoniae*

3. Test Protocol**3.1 Preparation of Sample Material**

Samples should be derived from cultures which are at 90-100 % confluence. PCR inhibiting substances may accumulate in the medium of older cultures. For these sample materials a DNA extraction (e.g. MB DNA Extraction Kit Cat # 56-1100) is strictly recommended prior testing. Penicillin and streptomycin in the culture media do not inhibit mycoplasma or affect test sensitivity. Only cell culture supernatant should be applied to test for mycoplasma. Cell pellets should only be tested after suitable DNA extraction, since debris will interfere with the PCR reaction. With average titers at 10^6 and a maximum titer at 10^8 you will find sufficient mycoplasma in the supernatant to guarantee a sensitive PCR. However, other materials that can be tested are Fetal Calf Serum, vaccines, and paraffin-embedded samples following DNA extraction. If necessary, templates for PCR analysis are prepared by DNA extraction using commercially available extraction kits (MB DNA Extraction Kit Cat. No. 56-1100). Please be sure to remove any alcohol containing wash buffer from the preparation to avoid coelution of alcohol and sample material. Any remaining alcohol may inhibit the PCR. 2 μ l of the extract can be used directly as PCR template. To avoid false positive results, we recommend the use of the PCR grade water delivered with the kit, aerosol-preventive filter tips and gloves.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

for ABI 7500

Detector Settings:

mycoplasma Target Probe: Reporter - FAM Quencher - none
Internal Control Probe: Reporter - VIC Quencher - none



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

Program Step 1: Pre-incubation

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

target	<i>Mycoplasma</i>	Internal control
channel	FAM	VIC

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

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
- 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 PCR Master Mix Setup

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

Pipetting scheme:

	for 1 reaction	for 25 reactions-
water (white cap)	8.0 μl	200.0 μl
primer/probe/nucleotide mix*	14.0 μl	350.0 μl
Internal Control DNA (yellow cap)	1.0 μl	25.0 μl
polymerase (5 U/ μl)	0.2 μl	5.0 μl
+ template DNA, NC or PC	2.0 μl	

* (red cap, white cap or black cap)

For other polymerase concentrations the amount of enzyme and the amount of water added to the mix need to be adjusted.

Aliquot 23 μl of master mix into each PCR reaction tube.



The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 60 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.

Add 2 μl of sample (as described above) to PCR reaction tube per sample being tested. After pipetting the negative control (2 μl of water or negative control of DNA extraction/reaction), the tube must be sealed before proceeding with the samples. Also pipetting of the samples and sealing the tubes must be completed before proceeding with the positive control (2 μl / reaction) in order to avoid cross contamination.

3.5 Result Interpretation

The presence of *mycoplasma* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the *Mycoplasma* 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. *Mycoplasma* 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 *mycoplasma* DNA loads in the sample.

<i>Mycoplasma</i> PCR	Internal Control	Interpretation
positive	irrelevant	<i>Mycoplasma</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>Mycoplasma</i> negative

4. Trouble Shooting

Before repeating a negative and a positive control run please check the cycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- activity of *Taq* polymerase is insufficient or enzyme not compatible with the kit buffer
- programming mistake
- pipetting mistake
- sample elution buffer and sample used to complete the negative control are different

5. Instrument Compatibility

Instrument	type 1	type 2
LightCycler® 1.2	+ ^v	-
LightCycler® 1.5	+	-
LightCycler® 2.0	+	o
LightCycler® 480	+	o
Rotorgene 3000	+	o
Rotorgene 6000 (5-plex)	+ ^v	o
ABI Prism® 7000	-	+
ABI Prism® 7300	-	+
ABI Prism® 7500	-	+ ^v
ABI Prism® 7700	-	+
ABI Prism® 7900	-	+
iCycler iQ®	o	o
iQ™5	+	o
Opticon 2	-	o
Chromo 4	o	o
MX3000P	o	o
MX4000	o	o

+ = recommended Kit version

- = the internal control is not detectable

o = untested but presumed to be compatible

v = validated

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 contamination 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*, *Onar*, *Mynox* and *Mycoplasma Off* are registered trademarks 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 100 µl each

51-1723	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , NC 001723	+/- 10	ng / 100 µl
51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566	+/- 10	ng / 100 µl
51-0792	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , DSMZ 792	+/- 10	ng / 100 µl
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571	+/- 10	ng / 100 µl
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415	+/- 10	ng / 100 µl
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177	+/- 10	ng / 100 µl
51-0111	<i>M. hominis</i> , NC 010111	+/- 10	ng / 100 µl
51-0112	<i>M. orale</i> , NC 010112	+/- 10	ng / 100 µl
51-0113	<i>M. salivarium</i> , NC 010113	+/- 10	ng / 100 µl
51-0115	<i>M. gallisepticum</i> , NC 010115	+/- 10	ng / 100 µl
51-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> , NC 010116	+/- 10	ng / 100 µl
51-0117	<i>M. fermentans</i> PG19, NC 010117	+/- 10	ng / 100 µl
51-0119	<i>M. pneumoniae</i> , NC 010119	+/- 10	ng / 100 µl
51-0129	<i>M. arginini</i> , NC 010129	+/- 10	ng / 100 µl
51-0130	<i>M. hyorhinis</i> , NC 010130	+/- 10	ng / 100 µl
51-0162	<i>M. arthritidis</i> , NC 010162	+/- 10	ng / 100 µl
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195	+/- 10	ng / 100 µl

Quantification Standard 100 µl each

52-0112	<i>Mycoplasma orale</i> DNA Standard	1x10 ⁶	genomes/µl
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard	1x10 ⁶	genomes/µl
52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	1x10 ⁶	genomes/µl

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