

Venor® GeM-qEP

Mycoplasma Detection Kit for qPCR

- Type 1 -

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
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0	6
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)	7
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes	8
3.5 Interpretation der Ergebnisse	9
4. Fehleranalyse	9
5. Gerätekompatibilität	9

Contents

1. Reagents and Materials	10
1.1 Test Kit Components	10
1.2 Stability and Storage	10
1.3 Supplemental Requirements	10
2. Application and Test Principle	11
2.1 Specificity	11
2.2 Sensitivity	12
3. Test Protocol	12
3.1 Preparation of Sample Material	12
3.2 Rehydration of the Reagents	13
3.3 Experimental Protocols and Result Reading	14
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0	14
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)	15
3.4 PCR Master Mix Setup	16
3.5 Result Interpretation	16
4. Trouble shooting	17
5. Instrument Compatibility	17

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

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 9)
- 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 beschriebene Direkt-nachweis- 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. Durch die Verwendung des hitzelabilen 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 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. bovirhinis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sualvi</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>	

*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-freien Wasser (im Kit enthalten)

<i>Positive Control DNA</i>	300 µl
<i>Internal Control DNA</i>	300 µl
3. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

3.3 Programmierung und Auswertung

3.3.1 *LightCycler*® 1.2, 1.5 und 2.0

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None

Temperaturprofil [°C]	Segment 1
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



***LightCycler*® 2.0:**

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

Eine Anleitung zur Programmierung des *LightCycler*® 480 ist auf unserer Internetseite unter www.minerva-biolabs.com/de/vgm.html verfügbar.

Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen	45
Analysemodus	Quantification

Temperaturprofil [°C]	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
Zieltemperatur [°C]	95.0	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

<u>Temperaturprofil [°C]</u>	<u>Segment 1</u>
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	<i>Mycoplasmen</i>	Interne Kontrolle
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



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

Target *Mycoplasmen*: Green (470-510 nm)
Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)

Programmschritt 2: Amplifikation

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

Auswertung der Rohdaten:

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

- 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 plazieren. 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.

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

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

Pipettierschema:

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

+ Template DNA/ NK oder PK 2,0 μ l

*(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 μ l auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 2 μ l deionisiertem Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 2 μ l Probe oder 2 μ l 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	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. arthritis</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. bovigentialium</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. indienne</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sualvi</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. turmidiae</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 titer 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.

The preparation of sample material could be performed by one of the following methods:

Heat-inactivation of the sample material

The templates for the PCR analysis are prepared by direct heating of the cell culture supernatant or the biological sample material:

- 100 μ l liquid supernatant of the sample material is transferred into a sterile reaction tube;
- the supernatant is incubated at 95 °C for 10 minutes;
- the supernatant is centrifuged briefly (5 seconds, 1000 x g) to remove cellular debris.
- The supernatant is used in the PCR. Alternatively, the DNA can be purified with a commercial extraction kit (e.g. MB DNA Extraction Kit Cat # 56-1100).

Enrichment of mycoplasma by centrifugation

- 1 ml supernatant of the sample material is transferred into a sterile reaction tube;
- the supernatant is centrifuged (15 minutes, 10.000 x g) to sediment mycoplasma particles. Alternatively: centrifuge the supernatant 6 min with 13.000 x g.
- The supernatant is rejected and the pellet is suspended into 50 μ l buffer (10 mm Tris, pH 8.4).
- The sample should be vortexed and finally heated up to 95 °C for 10 min.

The extracts can be stored at a temperature of at least -18 °C for a period of one year. Repeated freezing and defrosting, or storage in the refrigerator for longer than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100 μ g/ml DNA.

3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 μ l of Rehydration Buffer to the *Primer/Probe/Nucleotide Mixes* (each)
3. add appropriate amount of deionized, DNA-free water

<i>Positive Control DNA</i>	300 μ l
<i>Internal Control DNA</i>	300 μ l
3. incubate for 10 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

Programme 1: Preincubation

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.

Programme 2: Amplification

Cycles	45
Analysis Mode	Quantification

Temperature Targets [°C]	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
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

A protocol for LightCycler® 480 is available for download from our web page at www.minerva-biolabs.com/en/laboratory-diagnostics_vgm.html



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

Programme 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>Mycoplasma</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

Please check the correct settings for the filter combination:

Target *Mycoplasma*: filter green (470-510)
internal control: filter orange (585-610)

Program Step 2: Amplification

Setting	Cycling
Cycles	45
Denaturation	95°C for 5 sec
Annealing	55°C for 10 sec —> acquiring to Cycling A (green and orange)
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 *linear scale* and then *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.

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
<hr/>		
+ 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	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