

Quantification Standard

Genomische DNA von *Legionella pneumophila*

Inhaltsverzeichnis

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

Contents

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

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

Quantification Standard

grüner Verschluss

genomische DNA von *Legionella pneumophila*, ATCC 33152, DSM 7513,
in Tris-HCl-Puffer pH 8,5, 100 µl

10 mM Tris-HCl Buffer pH 8,5

weißer Verschluss

10 mM Tris-HCl Puffer, 3 x 1000 µl

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Die genomische DNA wird bei +2 °C - +8 °C versendet und muss bei mindestens -18 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Dazu kann die DNA-Lösung 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

Mikrozentrifuge

Mikroliterpipetten und Filterspitzen

Vortexer

2. Produktbeschreibung und Anwendungsgebiete

Die genomische DNA wurde aus Flüssigkulturen von *Legionella pneumophila* (ATCC 33152, DSM 7513) in Standard-Anzuchtmedium BCYE extrahiert. Die Konzentration wurde photometrisch und mittels real-time PCR bestimmt. Die Einstellung der angegebenen Konzentration erfolgte durch Verdünnen mit DNA-stabilisierendem Puffer.

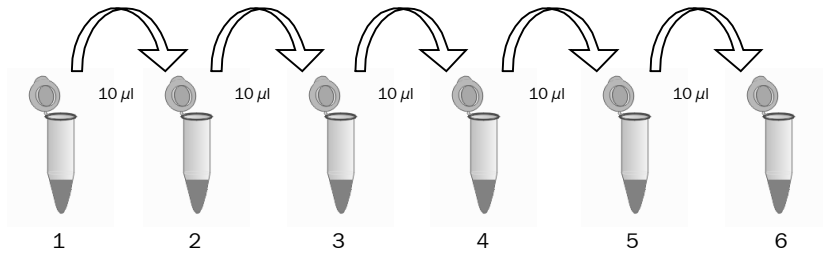
Genomische DNA von *Legionella pneumophila* dient als Amplifikationskontrolle bei der Durchführung von DNA-Amplifikationstests mittels konventioneller PCR. In der real-time PCR-Technik kann dieser DNA-Standard mit definierter Konzentration an Genomkopien als Calibrator zur Erstellung von Standardreihen dienen. Dazu wird die Ausgangslösung in 1:10 Verdünnungsstufen mit 10 mM Tris-HCl pH 8,5 verdünnt und als Probe für die PCR eingesetzt. Die Software der einzelnen real-time PCR-Geräte berechnet aus den generierten Daten eine Standardreihe, mit deren Hilfe unbekannte DNA-Konzentrationen bestimmt werden können.

3. Durchführung

3.1 Herstellung der Verdünnungsreihe

1. Die DNA-Lösung und der mitgelieferte 10 mM Tris-HCl Puffer werden zügig aufgetaut.
2. Sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße werden fortlaufend nummeriert und mit je 90 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 befüllt.
3. Die DNA-Lösung wird kurz (1 bis 2 Sekunden) bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
4. In das Reaktionsgefäß Nr. 1 werden 10 µl der DNA-Lösung gegeben, das Gefäß verschlossen und für kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.

5. 10 µl des Inhalts von Reaktionsgefäß Nr. 1 werden in das Reaktionsgefäß Nr. 2 überführt.
6. Das Reaktionsgefäß Nr. 2 wird verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
7. 10 µl des Inhalts von Reaktionsgefäß Nr. 2 werden in das Reaktionsgefäß Nr. 3 überführt.
8. Das Reaktionsgefäß Nr. 3 wird verschlossen und kurz bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.
9. Für die weiteren Reaktionsgefäße der Verdünnungsreihe wird in gleicher Weise verfahren.



3.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung des Amplifikationstests wird die Verwendung eines validierten PCR-Assays (z.B. Minerva Biolabs Onar® *Legionella* spp. Diagnostic Kit für die konventionelle oder real-time IVD PCR (Bestellnr. 21-1025/21-2025) oder die Aqua Screen® PCR Diagnostic Kits konventionell für den Nachweis von *Legionella* ssp. oder *Legionella pneumophila* in Wasserproben (Bestellnr. 33-1025/33-2025/33-3025 oder 34-1025/34-2025/34-3025) empfohlen.

Die Durchführung erfolgt dann gemäß dem Kit-Handbuch.

Die eingesetzte Menge an Probe bestimmt die Kopienanzahl pro PCR-Ansatz:

Reaktionsgefäß Nr.	2 µl Probenvolumen	2,5 µl Probenvolumen	5 µl Probenvolumen
1	2x10 ⁵ Genomkopien	2,5x10 ⁵ Genomkopien	5x10 ⁵ Genomkopien
2	2x10 ⁴ Genomkopien	2,5x10 ⁴ Genomkopien	5x10 ⁴ Genomkopien
3	2x10 ³ Genomkopien	2,5x10 ³ Genomkopien	5x10 ³ Genomkopien
4	200 Genomkopien	250 Genomkopien	500 Genomkopien
5	20 Genomkopien	25 Genomkopien	50 Genomkopien
6	2 Genomkopien	2,5 Genomkopien	5 Genomkopien

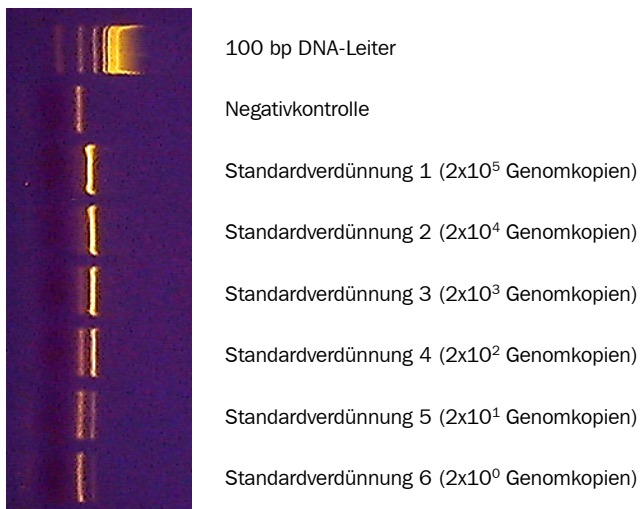
Bei real-time PCR-Geräten müssen die PCR-Ansätze der Standardreihe als Standard markiert und die vorgelegten Konzentrationen angegeben werden. Nur so kann die Software nach Beendigung der Reaktion die Standardreihe berechnen.

3.3 Auswertung

3.3.1 Konventionelle PCR

In der konventionellen PCR müssen die Intensitäten der DNA-Banden im Agarosegel bei Verwendung eines validierten PCR-Assays mit steigender DNA-Konzentration linear zunehmen. Nur dann können die Intensitäten der Banden von Proben mit unbekannter DNA-Konzentration mit denen der Standards verglichen werden. So kann man eine semiquantitative Aussage zur DNA-Konzentration in der unbekanntenen Probe treffen.

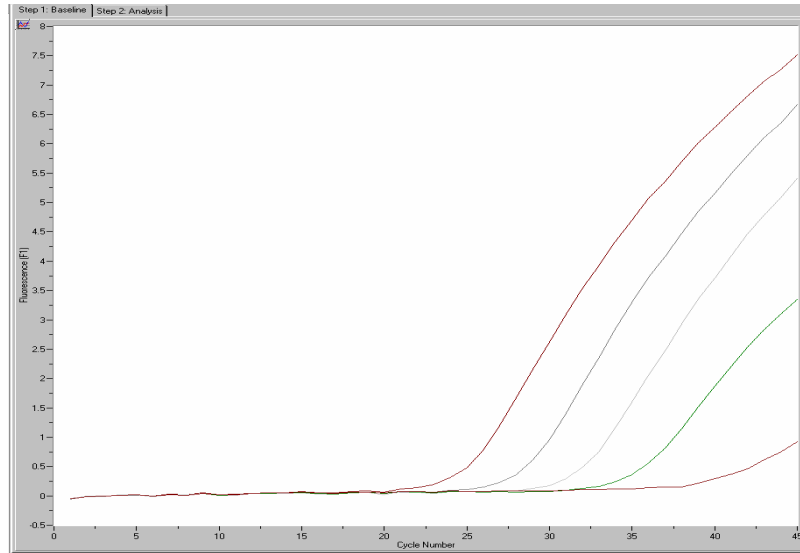
Folgendes Gelbild wurde mit dem Onar[®] *Legionella spp.* Diagnostic Kit für konventionelle PCR der Firma Minerva Biolabs GmbH, einem 1,5%igen Agarosegel mit SYBR Green[®] und einer handelsüblichen Digitalkamera generiert.



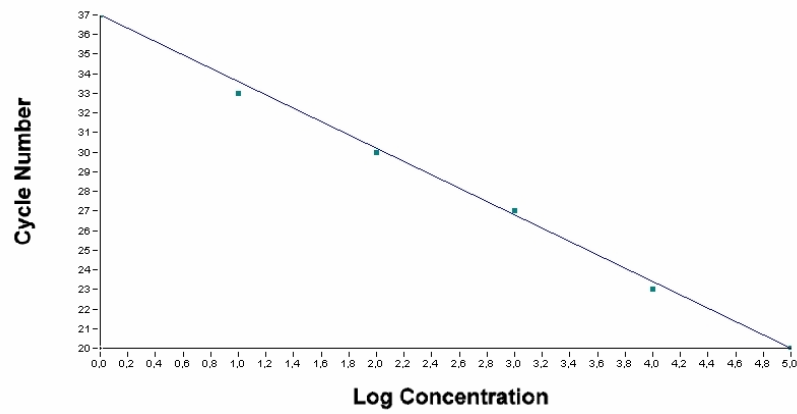
3.3.2 Real-time PCR

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

Folgende grafische Darstellungen wurden mit dem Onar®Lp-QP *Legionella* spp. Diagnostic Kit for real-time PCR und dem LightCycler® Instrument detektiert.



Amplifikation der Verdünnungsreihe mit 10^4 bis 10^0 Genomkopien von *Legionella pneumophila* pro PCR-Ansatz. Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal 1.



Generierte Standardreihe unter Verwendung der Second Derivative Maximum - Methode des LightCycler®.

1. Reagents and Materials

1.1 Components

Instruction manual

Quantification Standard green cap
genomic DNA of *Legionella pneumophila*, ATCC 33152, DSM 7513,
in Tris-HCl Buffer pH 8.5, 100 μ l

10 mM Tris-HCl buffer pH 8,5 white cap
3 x 1000 μ l

1.2 Stability and Storage

Genomic DNA is stable during refrigerated shipping and should be stored below -18°C . The DNA solution should be aliquoted in order to avoid repeated freezing and thawing. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our website).

1.3 Supplemental Requirements

microcentrifuge

micro pipettes and filter tips

vortex

2. Application and Test Principle

The quantification standard is genomic DNA extracted from liquid cultures of *Legionella pneumophila* (ATCC 33152, DSM 7513) in standard legionella growth media BCYE. The concentration was determined photometrically and by real-time PCR. The DNA concentration was adjusted by dilution with DNA stabilizing buffer.

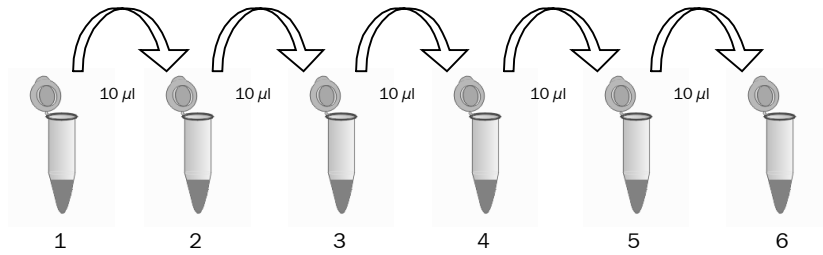
Genomic DNA of *Legionella pneumophila* is used as a control template when DNA amplification tests by conventional PCR are performed. With the real-time PCR technology, this titrated DNA standard with a defined concentration of genome copies is used as calibrator to generate standard curves. Therefore the provided solution is diluted in a 10x dilution series with 10 mM Tris-HCl buffer and used as a PCR sample. With the generated fluorescent data, the software provided with the real-time PCR instrument calculates a standard curve, which can be used to determine the DNA concentration of unknown samples.

3. Protocol

3.1 Preparation of the Dilution Series

1. Thaw DNA solution and provided 10 mM Tris-HCl buffer.
2. Label six 1.5 ml reaction tubes consecutively and fill each with 90 μ l of 10 mM Tris-HCl buffer.
3. Vortex DNA solution briefly (1 to 2 seconds) at medium speed.
4. Add 10 μ l of the DNA solution to reaction tube no. 1, close the tube and vortex briefly at medium speed.

5. Add 10 μl of the content of reaction tube no. 1 to reaction tube no. 2.
6. Close the tube and vortex briefly at medium speed.
7. Add 10 μl of the content of reaction tube no. 2 to reaction tube no. 3.
8. Close the tube and vortex briefly at medium speed.
9. Proceed with the following reaction tubes of the dilution series in the same way.



3.2 PCR

Performing DNA amplification with the use of validated PCR assays is highly recommended, eg. Minerva Biolabs' Onar[®] *Legionella* spp. Diagnostic Kit for conventional and real-time IVD PCR (Order No. 21-1025/21-2025) or Aqua Screen[®] PCR Diagnostic Kits for *Legionella* spp. and *L. pneumophila* in water samples (Order No. 33-1025/33-2025/33-3025 or 34-1025/34-2025/34-3025). Please follow the PCR kit manual.

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

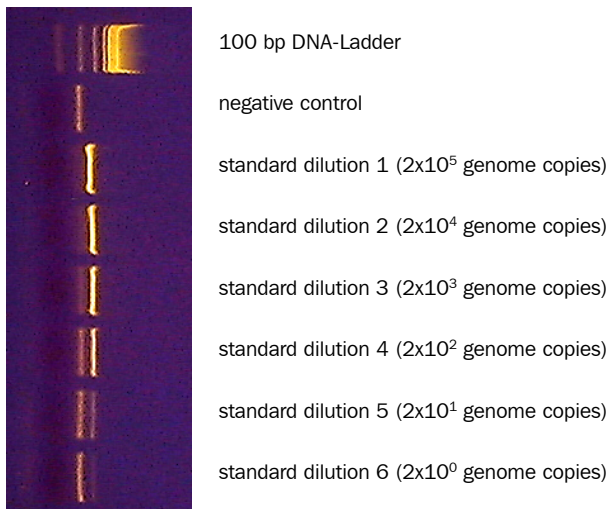
Reaction tube no.	2 μl sample volume	2,5 μl sample volume	5 μl sample volume
1	2×10^5 genome copies	$2,5 \times 10^5$ genome copies	5×10^5 genome copies
2	2×10^4 genome copies	$2,5 \times 10^4$ genome copies	5×10^4 genome copies
3	2×10^3 genome copies	$2,5 \times 10^3$ genome copies	5×10^3 genome copies
4	200 genome copies	250 genome copies	500 genome copies
5	20 genome copies	25 genome copies	50 genome copies
6	2 genome copies	2,5 genome copies	5 genome copies

3.3 Evaluation

3.3.1 Conventional PCR

With validated assays for conventional PCR, the intensity of the DNA bands in the agarose gel should increase linearly with ascending DNA concentration per reaction, when validated PCR assays are used. Only then the intensity of DNA bands of unknown samples can be compared to the intensities of the standards bands. Thus the DNA concentration in the unknown sample can be determined semi-quantitatively.

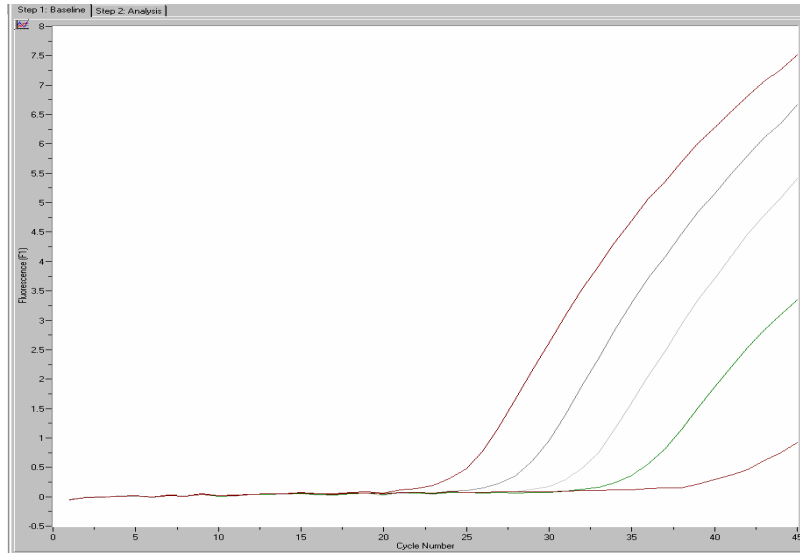
The following gel picture was generated using Minerva Biolabs' Onar® *Legionella* spp. Diagnostic Kit for conventional PCR, a 1,5% agarose gel with SYBR Green® and a digital camera.



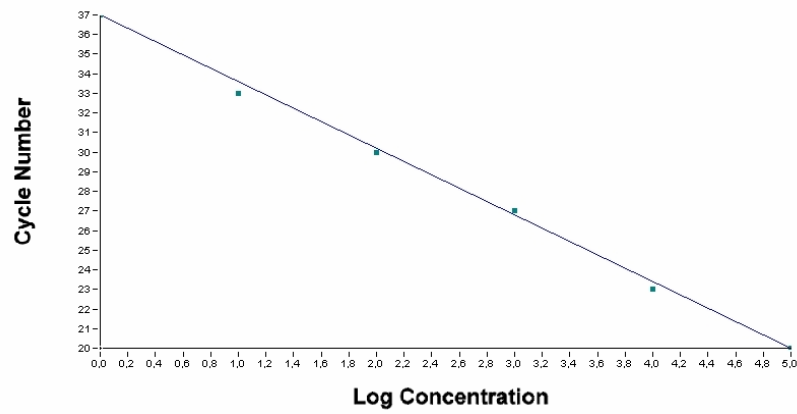
3.3.2 Real-time PCR

In real-time PCR the C_t -values should decrease linearly with ascending DNA concentration per reaction, when validated PCR assays are used. The software provided with the real-time PCR instrument calculates a standard curve and slope using the DNA concentrations stated by the user and the appendant C_t -values. Also the C_t -values of samples with unknown DNA concentrations are automatically compared to the standard curve and concentrations are assigned.

The following figures were generated using Minerva Biolabs' Onar® Lp-QP *Legionella spp.* Diagnostic Kit for real-time PCR and the LightCycler® instrument.



Amplified dilution series of 10^4 - 10^0 genome copies of *Legionella pneumophila* as starting template.. The fluorescent channel was set to F1.



Standard curve generated with the LightCycler® instrument using second derivative maximum method.

Limited Product Warranty

This warranty limits our liability to replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

Notice to Purchaser

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

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group. Onar and Aqua Screen are registered trademarks of Minerva Biolabs.

EG-Konformitätserklärung EC Conformity Declaration

Minerva Biolabs GmbH, Köpenicker Strasse 325, 12555 Berlin, Germany

Der bezeichnete Kit entspricht den einschlägigen grundlegenden Anforderungen der aufgeführten EG-Richtlinien und Normen. Bei einer nicht mit uns abgestimmten Änderung des Kits verliert diese Erklärung ihre Gültigkeit.

The device named below fulfills the relevant fundamental requirements of the EC directives and standards listed. In the case of unauthorized modifications to the device, this declaration becomes invalid.

Produktbezeichnung, Device name:
VQS-101 Quantification Standard

Produkttyp, Device type:
Genomic DNA of *Legionella pneumophila*

Einschlägige EU-Richtlinien, Relevant EC directives:
EU-Richtlinie 98/79/EG für In-Vitro-Diagnostika vom 27.10.1998

26.02.2004

Berlin, Datum



Geschäftsführung, Managing Director



Projektmanagement, Project Management

Minerva Biolabs' International Distributors

Argentina

Chemetron Latinoamericana S.A.
Tel: +54 11 4393 9613
Fax: +54 11 4953 8918
Web: www.chemetron.com.ar
Email: info@chemetron.com.ar

Australia

Biocene Pty. Ltd.
Tel.: +61 2 99668166
Fax: +61 2 99668300
jenny@biocene.com

Austria

BioProducts
Tel: +43 2268 61 65 11
Fax: +43 2268 61 65 44
Email: info@bioproducts.at
Web: www.bioproducts.at

Belgium, Luxembourg

Lucron Bioproducts bvba
Tel: +32 92 82 05 31
Fax: +32 92 82 05 32
Email: info@lucronbioproducts.com
Web: www.lucronbioproducts.com

Canada + USA

Medicorp Inc.
Tel: +1 514 7331 900
Fax: +1 514 7331 212
Email: mktg@medicorp.com
Web: www.medicorp.com

Czech Republic

BIO-Consult Laboratoriery spol. sro.
Tel: +42 2 4447 1239
Fax: +42 2 4447 1239
Email: info@bioconsult.cz
Web: www.bioconsult.cz

Finland

Immuno Diagnostic Oy
Tel: +358 3 615 370
Fax: +358 3 682 2039
Email: info@immunodiagnostic.fi
Web: www.immunodiagnostic.fi

Germany & Eastern Europe

Mast Diagnostica GmbH
Tel: +49 4533 2007 0
Fax: +49 4533 2007 68
Email: verkauf@mast-diagnostica.de
Web: www.mastgrp.com

Israel

NBT New Biotechnology Ltd.
Tel: +972 2 673 2001
Fax: +972 2 673 1611
Email: nbtsales@nbtld.com

Italy

Biospa
Tel: +39 2 891 391
Fax: +39 2 891 20996
Email: biospa@spaspa.it
Web: www.spaspa.it/biospa.htm

Korea

Morebio
Tel: +82 2 406 2942
Fax: +82 2 406 2942
Email: info@morbeio.co.kr
Web: www.morebio.co.kr

Lithuania

Interlux
Tel: +370 5 27 86 850
Fax: +370 5 27 96 728
Email: marius@interlux.lt
Web: www.interlux.lt

Netherlands

Lucron Bioproducts B.V.
Tel: +31 485 51 16 75
Fax: +31 485 51 20 52
Email: lucron@lucron.nl
Web: www.lucron.nl

New Zealand

Medical & Scientific Ltd.
Tel: +64 96 34 10 36
Fax: +64 96 34 51 46
Email: nzms@nzms.co.nz
Web: www.nzms.co.nz

Norway

E. Pedersen & Son
Tel: +47 22 95 59 59
Fax: +47 22 95 59 40
Email: eped@eped.com
Web: www.eped.com

Poland

STI
Tel: +48 61 641 77 59
Fax: +48 61 641 77 58
Email: office@sti.biz.pl
Web: www.sti.biz.pl

Portugal

Quilaban Lda.
Tel: +21 923 63 50
Fax: +21 923 63 89
Email: quilaban@quilaban.pt
Web: www.quilaban.pt

Slovenia

Kemomed d.o.o.
Tel: +386 4 201 50 50
Fax: +386 4 201 50 55
Email: info@kemomed.si
Web: www.kemomed.si

Spain

LacClinics S.A.
Tel: +34 3 446 47 00
Fax: +34 3 348 10 39
Email: info@labclinics.com
Web: www.labclinics.com

Sweden

ANL-Produkter AB
Tel: +46 8 99 00 90
Fax: +46 8 99 20 40
Email: info@anl.se
Web: www.anl.se

Switzerland

Socochim SA
Tel: +41 21 721 04 50
Fax: +41 21 721 04 51
Email: info@socochim.ch
Web: www.socochim.ch

Turkey

Genomed Saglik Hizmetleri A.S.
Tel: +90 212 220 15 64
Fax: +90 212 248 20 00
Email: muratyazici@genomedtr.com
Web: www.genomed-biotech.com

Related Products

Taq DNA Polymerase

53-0050	MB TAQ DNA Polymerase	50	units
53-0100	MB TAQ DNA Polymerase	100	units
53-0200	MB TAQ DNA Polymerase	200	units
53-0250	MB TAQ DNA Polymerase	250	units

Diagnostic Kits for Conventional PCR

21-1025	Onar [®] Ls, <i>Legionella</i> sp.	25	tests
21-1100	Onar [®] Ls, <i>Legionella</i> sp.	100	tests
21-1250	Onar [®] Ls, <i>Legionella</i> sp.	250	tests
20-1025	Venor [®] Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25	tests
20-1100	Venor [®] Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	tests
20-1250	Venor [®] Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250	tests

Diagnostic Kits for Real-Time PCR

21-2025	Onar [®] Ls-QP, <i>Legionella</i> species	25	tests
21-2100	Onar [®] Ls-QP, <i>Legionella</i> species	100	tests
21-2250	Onar [®] Ls-QP, <i>Legionella</i> species	250	tests
21-3025	Onar [®] Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	25	tests
21-3100	Onar [®] Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	100	tests
21-3250	Onar [®] Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	250	tests
20-2025	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25	tests
20-2100	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	tests
20-2250	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250	tests

Quantification Standards 100 µl each

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard	1x10 ⁶	genomes/µl
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

Genomic DNA Extracts 100 µl each

51-0101	<i>Legionella pneumophila</i> , ATCC 33152	+/- 10	ng / 100 µl
51-1514	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> , DSMZ 7514	+/- 10	ng / 100 µl
51-1515	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i> , DSMZ 7515	+/- 10	ng / 100 µl
51-1368	<i>Legionella bozemanii</i> , NC 011368	+/- 10	ng / 100 µl
51-1370	<i>Legionella dumoffii</i> , NC 011370	+/- 10	ng / 100 µl
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> , NC010116	+/- 10	ng / 100 µl
51-0117	<i>M. fermentans</i> PG19, NC 010117	+/- 10	ng / 100 µl
51-0119	<i>M. pneumoniae</i> , NC010119	+/- 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. arthritis</i> , NC 010162	+/- 10	ng / 100 µl
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195	+/- 10	ng / 100 µl

DNA Remover™

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