

Quantification Standard

Genomische DNA von *Mycoplasma pneumoniae*

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

genomische DNA von *Mycoplasma pneumoniae* in Tris-HCl-Puffer, pH 8,5, in titrierter Konzentration (1×10^6 Kopien/ μ l), 100 μ l

grüner Verschluss

Tris-HCl 10 mM

Tris-HCl 10 mM, 3 x 1000 μ l

weißer Verschluss

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 dieses Produkt bis zum im Garantiezertifikat angegebenen Verfalldatum haltbar.

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

Mikrozentrifuge

Mikroliterpipetten und Filterspitzen

Vortexer

2. Produktbeschreibung und Anwendungsgebiete

Bei diesem Produkt handelt es sich um genomische DNA, extrahiert aus Flüssigkulturen von *Mycoplasma pneumoniae* (NCTC 010119) in Standard-Anzuchtmedium. Die Konzentration wurde photometrisch und mittels real-time PCR bestimmt. Die Einstellung der angegebenen Konzentration erfolgte durch Verdünnen mit DNA-stabilisierendem Puffer.

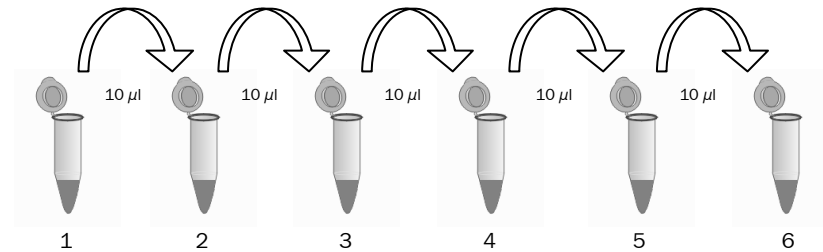
Genomische DNA von *Mycoplasma pneumoniae* dient als Amplifikationskontrolle bei der Durchführung von DNA-Amplifikationstests mittels konventioneller PCR, z.B. zur Kontaminationskontrolle in der Zellkulturtechnik. In der real-time PCR-Technik kann dieser DNA-Standard mit definierter Konzentration an Genomkopien als Calibrator zur Erstellung von Standardreihen dienen. Dazu wird die Ausgangslösung in 1:10 Verdünnungsstufen mit Tris-HCl 10 mM 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 μ l 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 μ l 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 Venor[®]Mp *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit für konventionlle PCR, Bestellnr. 20-1025 oder Venor[®]Mp-QP *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit für qPCR, Bestellnr. 20-2025;20-2100;20-250) empfohlen.

Die Durchführung erfolgt dann gemäß dem Kit-Handbuch.

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

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 Eigenschaften der Standardreihe berechnen.

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

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 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 unbekannt Probe treffen.

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



100 bp DNA-Leiter

Negativkontrolle

Standardverdünnung 1 (2×10^5 Genomkopien)

Standardverdünnung 2 (2×10^4 Genomkopien)

Standardverdünnung 3 (2×10^3 Genomkopien)

Standardverdünnung 4 (2×10^2 Genomkopien)

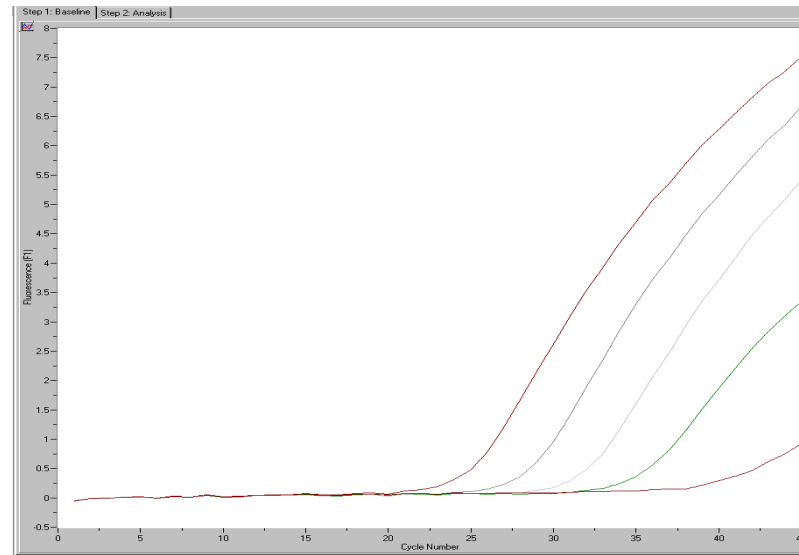
Standardverdünnung 5 (2×10^1 Genomkopien)

Standardverdünnung 6 (2×10^0 Genomkopien)

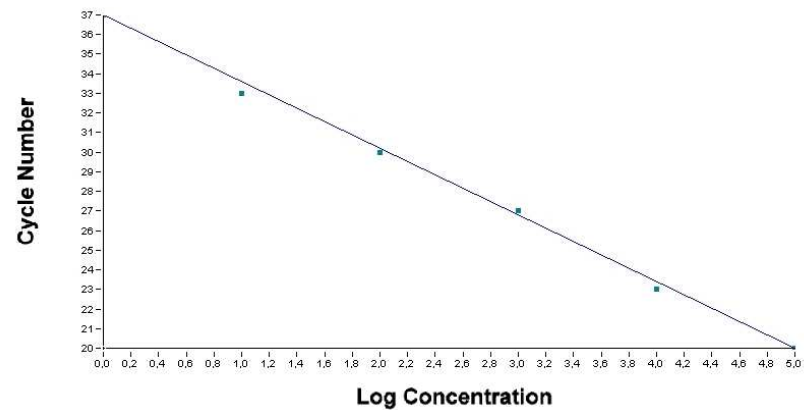
3.3.2 Real-time PCR

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

Folgende grafische Darstellungen wurden mit dem Venor[®]Mp-QP *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit für die qPCR der Firma Minerva Biolabs GmbH und dem LightCycler[®] Instrument generiert.



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



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 *Mycoplasma pneumoniae* in Tris-HCl Buffer pH 8.5
in titrated concentrations (1×10^6 copies/ μ l), 100 μ l

Tris-HCl 10 mM 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 product is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate.

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 *Mycoplasma pneumoniae* (NCTC 010119) in standard mycoplasma growth media. The concentration was determined photometrically and by real-time PCR. The DNA concentration was adjusted by dilution with DNA stabilizing buffer.

Genomic DNA of *Mycoplasma pneumoniae* is used as a control template when DNA amplification tests by conventional PCR are performed, eg. as contamination control in cell culturing.

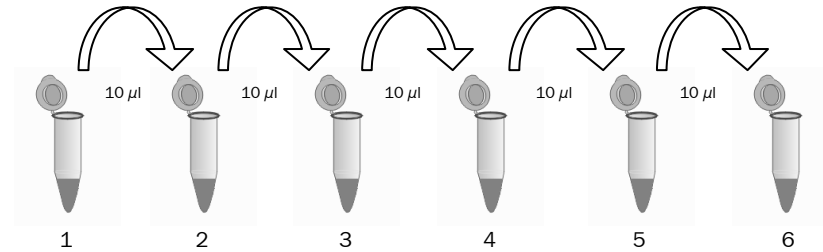
With the real-time PCR technology, this titrated DNA standard with a defined concentration of genome copies is used as calibrator to generate standard curves. Therefore the provided solution is diluted in a 10x dilution series with 10 mM Tris-HCl buffer and used as a PCR sample. With the generated fluorescent 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' Venor[®]Mp *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit for conventional PCR, order no. 20-1025; 20-1100; 20-1250 or Venor[®]Mp-QP *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit for real-time PCR, order no. 20-2025; 20-2100; 20-2250).

Please follow the PCR kit manual.

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

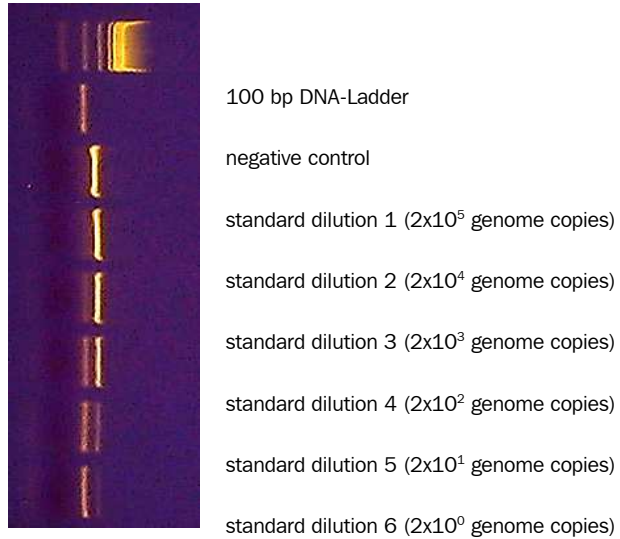
Reaction tube no.	2 μl sample volume	2,5 μl sample volume	5 μl sample volume
1	2×10^5 genome copies	$2,5 \times 10^5$ genome copies	5×10^5 genome copies
2	2×10^4 genome copies	$2,5 \times 10^4$ genome copies	5×10^4 genome copies
3	2×10^3 genome copies	$2,5 \times 10^3$ genome copies	5×10^3 genome copies
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 with ascending DNA concentration per reaction, when validated PCR assays are used. 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.

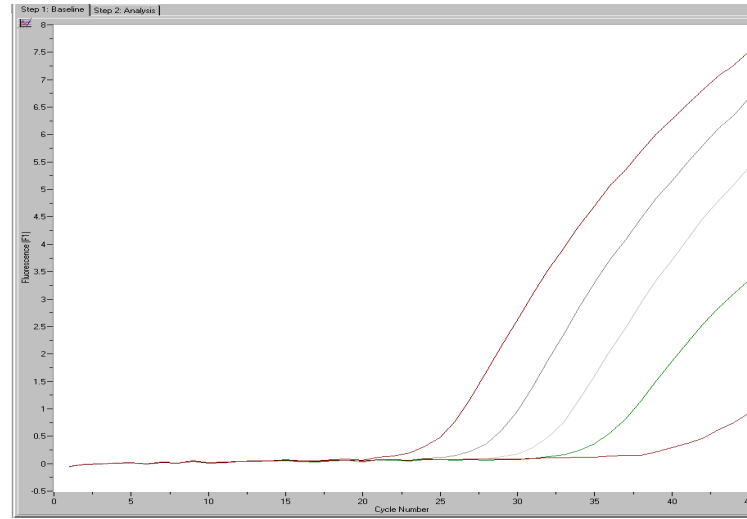
The following gel picture was generated using Minerva Biolabs' Venor[®]Mp *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit for conventional PCR. The PCR product were separated in a 1,5% agarose gel and stained with SYBR Green[®].



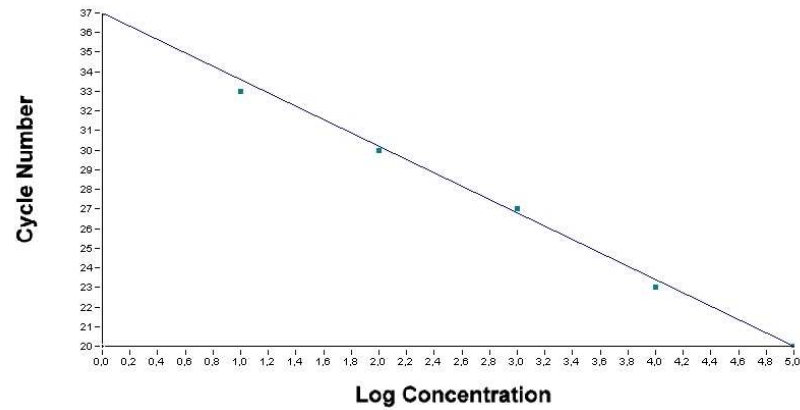
3.3.2 Real-time PCR

In real-time PCR the Ct-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 Ct-values. Also the Ct-values of samples with unknown DNA concentrations are automatically compared to the standard curve and concentrations are assigned.

The following figures were generated using Minerva Biolabs' Venor[®]Mp-QP *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostic Kit for qPCR and the LightCycler[®] instrument.



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



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

Minerva Biolabs' International Distributors

Argentina

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

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 qPCR

20-2025	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 1	25	tests
20-2100	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 1	100	tests
20-2250	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 1	250	tests
20-3025	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 2	25	tests
20-3100	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 2	100	tests
20-3250	Venor [®] Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Type 2	250	tests

Quantification Standards 100 µl each

52-0112	<i>Mycoplasma orale</i>	1x10 ⁶	genomes/µl
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1x10 ⁶	genomes/µl

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

DNA Remover™

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