

# Quantification Standard

## Genomische DNA von *Acholeplasma laidlawii*

### 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 <i>Real-time PCR</i>	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 <i>Real-time PCR</i>	8

## 1. Reagenzien und Materialien

### 1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

*Quantification Standard*

grüner Verschluss

genomische DNA von *Acholeplasma laidlawii* in Tris-HCl-Puffer, pH 8.5  
in titrierter Konzentration ( $1 \times 10^6$  Kopien/ $\mu$ l), 100  $\mu$ l

*Tris-HCl 10 mM*

weißer Verschluss

Tris-HCl 10 mM, 3 x 1000  $\mu$ l

### 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 *Acholeplasma laidlawii* (NCTC 010116) 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 *Acholeplasma laidlawii* dient als Amplifikationskontrolle bei der Durchführung von DNA-Amplifikationstests mittels konventioneller PCR, z.B. zur Kontaminationskontrolle in der Zellkulturtechnik.

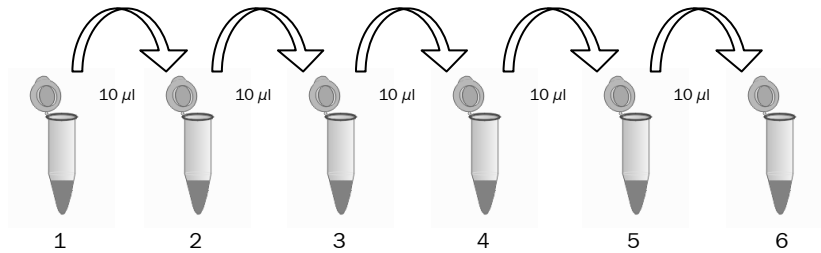
In der real-time PCR-Technik kann dieser DNA-Standard mit definierter Konzentration an Genomkopien als Calibrator zur Erstellung von Standardreihen dienen. Dazu wird die Ausgangslösung in 1:10 Verdünnungsstufen mit Tris-HCl 10 mM verdünnt und als Probe für die PCR eingesetzt. Die Software der einzelnen 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  $\mu$ 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  $\mu$ l der DNA-Lösung gegeben, das Gefäß verschlossen und für

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 , Bestellnr. 11-6025; 11-6100 (VenorGeM-qEP) für die real-time PCR) 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
<b>1</b>	2x10 <sup>5</sup> Genomkopien	2,5x10 <sup>5</sup> Genomkopien	5x10 <sup>5</sup> Genomkopien
<b>2</b>	2x10 <sup>4</sup> Genomkopien	2,5x10 <sup>4</sup> Genomkopien	5x10 <sup>4</sup> Genomkopien
<b>3</b>	2x10 <sup>3</sup> Genomkopien	2,5x10 <sup>3</sup> Genomkopien	5x10 <sup>3</sup> Genomkopien
<b>4</b>	200 Genomkopien	250 Genomkopien	500 Genomkopien
<b>5</b>	20 Genomkopien	25 Genomkopien	50 Genomkopien
<b>6</b>	2 Genomkopien	2,5 Genomkopien	5 Genomkopien

### 3.3 Auswertung

#### 3.3.1 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<sup>®</sup>GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit for real-time PCR der Firma Minerva Biolabs GmbH und dem LightCycler<sup>®</sup> Instrument generiert.

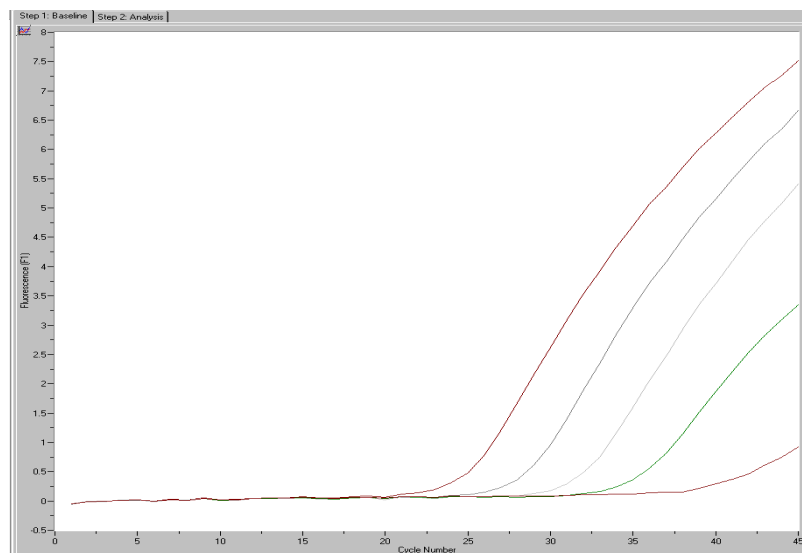


Abb. 2: Amplifikation der Verdünnungsreihe mit  $10^4$  bis  $10^9$  Genomkopien von *Acholeplasma laidlawii* pro PCR-Ansatz.

Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal 1.

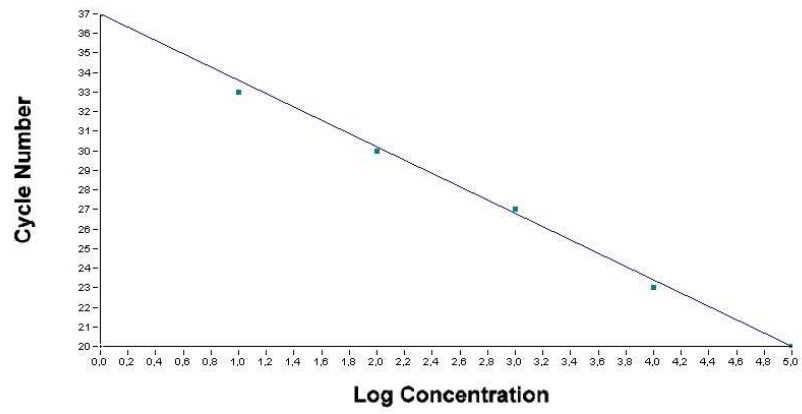


Abb. 3: generierte Standardreihe unter Verwendung der Second Derivative Maximum - Methode des LightCycler® und der Daten von Abb. 2

## NOTIZEN

## 1. Reagents and Materials

### 1.1 Components

Instruction manual

*Quantification Standard* green cap  
genomic DNA of *Acholeplasma laidlawii* in Tris-HCl Buffer pH 8.5  
in titrated concentrations ( $1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ l), 100  $\mu$ l

*Tris-HCl Buffer pH 8.5* white cap  
3 x 1000  $\mu$ 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 *Acholeplasma laidlawii* (NCTC 010116) 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 *Acholeplasma laidlawii* is used as a control template when DNA amplification tests by conventional PCR are performed, eg. as contamination control in cell culturing.

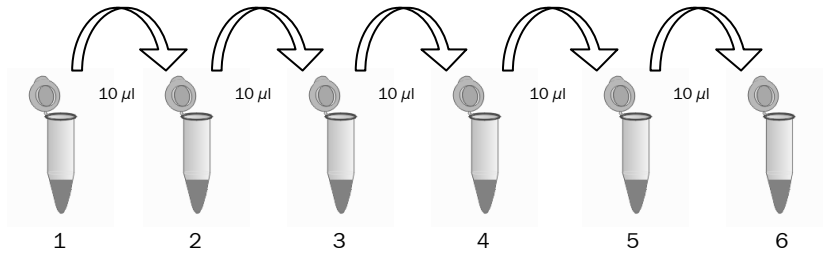
With the real-time PCR technology, this titrated DNA standard with a defined concentration of genome copies is used as calibrator to generate standard curves. Therefore the provided solution is diluted in a 10x dilution series with Tris-HCl Buffer pH 8.5 and used as a PCR sample. With the generated fluorescent 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  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl buffer.
3. Vortex DNA solution briefly (1 to 2 seconds) at medium speed.
4. Add 10  $\mu$ l of the DNA solution to reaction tube no. 1, close the tube and vortex briefly at medium speed.

5. Add 10  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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' VenorGeM<sup>®</sup>-qEP *Mycoplasma* Detection Kit for real-time PCR, order no. 11-6025; 11-6100). 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 $\mu\text{l}$ sample volume	2,5 $\mu\text{l}$ sample volume	5 $\mu\text{l}$ sample volume
<b>1</b>	$2 \times 10^5$ genome copies	$2,5 \times 10^5$ genome copies	$5 \times 10^5$ genome copies
<b>2</b>	$2 \times 10^4$ genome copies	$2,5 \times 10^4$ genome copies	$5 \times 10^4$ genome copies
<b>3</b>	$2 \times 10^3$ genome copies	$2,5 \times 10^3$ genome copies	$5 \times 10^3$ genome copies
<b>4</b>	200 genome copies	250 genome copies	500 genome copies
<b>5</b>	20 genome copies	25 genome copies	50 genome copies
<b>6</b>	2 genome copies	2,5 genome copies	5 genome copies

### 3.3 Evaluation

#### 3.3.1 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<sup>®</sup>GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit for real-time PCR and the LightCycler<sup>®</sup> instrument.

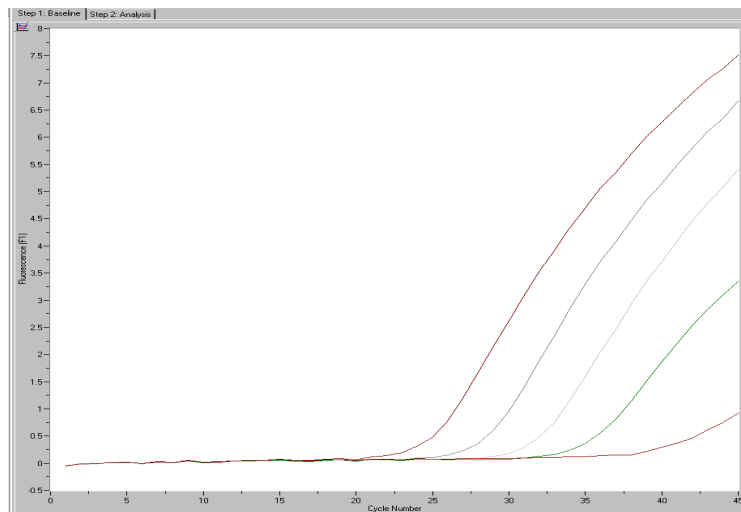


Fig. 2: Amplified dilution series of  $10^4$  down to  $10^0$  genome copies of *Acholeplasma laidlawii* as starting template. The fluorescent channel was set to F1.

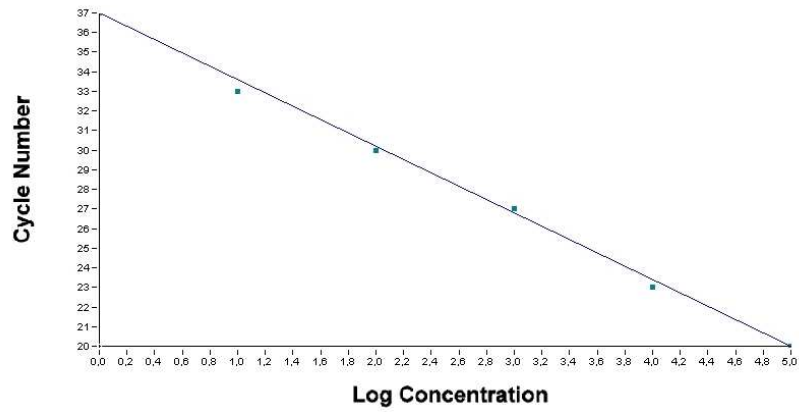


Fig. 3: Standard curve generated with the LightCycler® instrument using second derivative maximum method and the data from Fig. 2

## NOTES

*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.

<sup>§</sup>The Polymerase Chain Reaction (PCR) process is covered by patents owned by Hoffmann-La Roche. Use of the PCR process requires a license.

SYBR Green is a registered trademark of Molecular Probes.

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group.

VenorGeM-qEP, Mynox and Mycoplasma Off are registered trademarks of Minerva Biolabs.

## 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  
Email: 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 Laboratorijs 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

### Great Britain

Cambio Ltd.  
Tel: +44-1954-210 200  
Fax: +44-1954-210 300  
Email: support@cambio.co.uk  
Web: www.cambio.co.uk

### Greece

Varelas S.A.  
Tel: +30-210-5281 901  
Fax: +30-210-5220 926  
Email: varelas@otenet.gr  
Web: www.otenet.gr

### Hungary

Ferol Ltd.  
Tel: +36-1-220 8848  
Fax: +36-1-221 0229  
Email: ferol@biolab.hu  
Web: www.biolab.hu

### Ireland

Medical Supply Company  
Tel: +353-1-8224 222  
Fax: +353-1-8224 100  
Email: info@medical-supply.ie  
Web: www.medical-supply.ie

### Israel

Origolab Ltd.  
Tel: +972 2 566 9285  
Fax: +972 2 561 2120  
Email: origolab@netmedia.net.il

### 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

### 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

### 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

### 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

### Thailand

Biomed Diagnostics Co., Ltd.  
Tel: +66-2-8796 026  
Fax: +66-2-8796 065  
Email: somboon@biomedthai.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 <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella</i> species	25	tests
21-1100	Onar <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella</i> species	100	tests
21-1250	Onar <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella</i> species	250	tests
20-1025	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25	tests
20-1100	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	tests
20-1250	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250	tests

### Diagnostic Kits for Real-Time PCR

21-2025	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella</i> species	25	tests
21-2100	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella</i> species	100	tests
21-2250	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella</i> species	250	tests
20-2025	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25	tests
20-2100	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	tests
20-2250	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250	tests
11-4025	Venor <sup>®</sup> GeM-qEP Mycoplasma ssp. Dedection Kit	25	tests
11-4250	Venor <sup>®</sup> GeM-qEP Mycoplasma ssp. Dedection Kit	250	tests
11-6025	Venor <sup>®</sup> GeM-qDual Mycoplasma Dedection Kit with external Inhibition control	25	tests
11-6100	Venor <sup>®</sup> GeM-qDual Mycoplasma Dedection Kit with external Inhibition control	100	tests

### Quantification Standards 100 µl each

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	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 acidophilu</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. arthritis</i> , NC 010162	+/- 10	ng / 100 µl
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195	+/- 10	ng / 100 µl
51-1747	<i>M. penetrans</i> , NC	+/- 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