

**Venor® GeM Advance**  
***pre-aliquoted Mycoplasma PCR Detection Kit***  
**for gel electrophoresis analysis**

**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
3. Durchführung	3
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	3
3.2 Programmierung des Thermocyclers	4
3.3 PCR-Ansatz	5
3.4 Agarosegel-Lauf	6
3.5 Gelauswertung	6
4. Fehleranalyse	7
Anlage	14

**Contents**

1. Reagents and Materials	8
1.1 Kit Components	8
1.2 Stability and Storage	8
1.3 Supplemental Requirements	8
2. Application and Test Principle	9
3. Test Protocol	9
3.1 Preparation of Sample Material	9
3.2 Thermal Profile	10
3.3 PCR Setup	10
3.4 Agarose Gel Run	12
3.5 Gel Evaluation	12
4. Trouble Shooting	13
Appendix	14

# 1. Reagenzien und Materialien

## 1.1 Inhalt der Packung

Testansätze <i>Test Reaction Tubes</i> in PCR Gefäße vorgelegte Reagenzien (lyophilisierte Primer, dNTPs, internes Kontrolltemplate und Gelladepuffer)	je nach Packungsgröße 3, 6, 12 bzw. 30 Streifen mit jeweils 8 transparenten PCR-Gefäßen
Positivkontrolle <i>Positive Control Reaction Tubes</i> Testansätze zusätzlich mit DNA-Fragmenten des <i>Mycoplasma orale</i> -Genoms, mittels PCR hergestellt, nicht infektiös	je nach Packungsgröße 1, 2, 3 bzw. 5 Streifen mit jeweils 8 roten PCR-Gefäßen
Deckel für PCR Gefäße <i>Caps for PCR Tubes</i>	Streifen mit transparenten bzw. roten Deckeln für PCR-Gefäße
Rehydratisierungspuffer <i>Rehydration Buffer</i>	1,6 ml

## 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im *Guarantee Certificate* (online: <http://www.minerva-biolabs.com/>) auf der Verpackung angegebenen Datum haltbar.

## 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

beliebiger PCR-Thermocycler mit Deckelheizung  
DNA-Elektrophoreseapparat und Materialien zur Agarosegel-Elektrophorese  
Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen  
DNA-Polymerase



**Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB Taq DNA-Polymerase (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. Es kann bei der Verwendung anderer Polymerasen notwendig sein, den mit der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer zu verwenden.

## 2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Der Venor®GeM Advance Mykoplasmenachweis ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR-Methode erlaubt eine schnelle und sehr sensitive Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Mit Venor®GeM Advance sind 1 bis 5 fg Mykoplasmen-DNA, entsprechend 2-5 Mykoplasmen pro Probenvolumen, detektierbar. Die mitgelieferten Primer erlauben der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 270 bp und kann direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Das gewählte Template ist innerhalb der Spezies *Mycoplasma* hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit Venor®GeM Advance können daher neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen-spezies *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene Ureaplasma-Spezies detektiert werden.

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 wird nicht detektiert.

Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Amplifikationskontrolle. Bei einer erfolgreich verlaufenen PCR bildet sich in jedem Testansatz ein 191 bp großes Produkt, welches im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe erscheint.



**Venor®GeM Advance ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt und darf nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.**

## 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 interne 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. Auch wenn einzelne Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften können, steht im Zellkulturüberstand durch abgestorbene Mykoplasmen ausreichend DNA für einen positiven Nachweis zur Verfügung. 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.

Wird die Probe umgehend getestet, kann auf eine Probenvorbereitung verzichtet werden. Der erste Heizschritt des PCR-Protokolls bewirkt bereits die Lyse der im Probenmaterial enthaltenen Mykoplasmen sowie die Inaktivierung enthaltener DNAsen. Bei einer Lagerung der Proben für mehr als 2 Stunden vor Testung sollte eine Hitzeinaktivierung wie unten beschrieben durchgeführt werden.

Inhibierende 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. 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 sec, 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 Programmierung des Thermocyclers**

Die Durchführung der Programmierung Ihres PCR-Cyclers entnehmen Sie bitte dem Handbuch zum Gerät.

#### **Programm:**

1 Zyklus            94 °C für 2 min  
 39 Zyklen        94 °C für 30 sec  
                      55 °C für 30 sec  
                      72 °C für 30 sec

auf 4 °C bis 8 °C abkühlen



**Die Dauer der Vorinkubation bei 94 °C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung eventuell entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.**

### 3.3 PCR-Ansatz

#### 1. Ryhydratisierungspuffer mit Polymerase mischen:

Für eine optimale Vergleichbarkeit der Ansätze sollte die Polymerase nicht direkt zu den PCR-Ansätzen gegeben werden, sondern vorab mit dem Rehydratisierungspuffer vermischt und dann auf die PCR Reaktionsgefäße verteilt werden.

Die geplante Anzahl an Reaktionen (inkl. Negativ- und Positivkontrollen) wird ermittelt, eine weitere Reaktion zum Ausgleich eventueller Pipettierungenauigkeiten hinzugezählt (23 µl) und die benötigte Menge an Rehydratisierungspuffer und Polymerase (1 Unit/Reaktion) berechnet:

	Testansatz	Negativkontrolle	Positivkontrolle
Rehydratisierungspuffer	22,8 µl	22,8 µl	24,8 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.

Rehydratisierungspuffer intensiv vortexen (ca. 30 Sekunden), berechnete Menge mit der entsprechenden Menge an Polymerase in einem sauberen Reaktionsgefäß durch Anschnippen vermischen und kurz zentrifugiert.



**Verdünnte Polymerase nicht vortexen!**

#### 2. Rehydratisieren der PCR-Reagenzien

Die Streifen mit den Testansätzen sowie die Positivkontrollen werden aus den Verpackungen genommen und die benötigte Menge vorsichtig mit einer Schere abgetrennt. Nicht benötigte Ansätze werden zurückgelegt und der Beutel fest verschlossen.

Die PCR-Gefäße werden kurz zentrifugiert oder auf eine Tischplatte getippt, um die lyophilisierten Reagenzien am Boden des Gefäßes zu konzentrieren. Das Rehydratisierungspuffer/Polymerasegemisch wird á 23 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Die Positivkontrollen werden mit 25 µl rehydratisiert.



**Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen die Positivkontrolle erst nach Fertigstellung der Negativkontrollen und der Testansätze in einem getrennten Arbeitsschritt ansetzen.**

#### 3. Probenzugabe

Negativkontrolle: 2 µl deionisiertes Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion

Testansatz: 2 µl Probe

Positivkontrolle: keine weitere Zugabe notwendig

Die Ansätze werden mit den beiliegenden Deckeln dicht verschlossen, vorsichtig durch Anschnippen gemischt, kurz zentrifugiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in den Block des PCR-Cyclers gestellt und das Cyclerprogramm gestartet.

3.4 Agarosegel-Lauf

- 1,5 %iges Standard-Agarosegel, ca. 5 mm dick, mit 5 mm-Kamm
- 5 µl jedes PCR-Reaktionsansatzes pro Bahn auftragen
- Elektrophorese nach 2 cm Wegstrecke stoppen (je nach Elektrophoresekammer z.B. nach 20 Minuten bei 100 V)

3.5 Gelauswertung

Eine fehlerfreie PCR wird durch eine Bande bei 191 bp angezeigt. Bei Zunahme der Konzentration an Mykoplasmen-DNA (> 5x10<sup>6</sup> Partikel/ml) nimmt die Intensität der Internen Kontrolle durch die übermäßige Bildung des Mykoplasmen-Amplikons ab.

Relevante Amplikongrößen:

Interne Kontrolle	191 bp
<i>Mycoplasma spp.</i>	265-278 bp

(siehe auch Liste im Anhang)

Kontrollergebnisse:

Negativkontrolle	Bande bei 191 bp
Positivkontrolle	Bande bei 267 bp, aber auch zusätzliche Bande bei 191 bp möglich

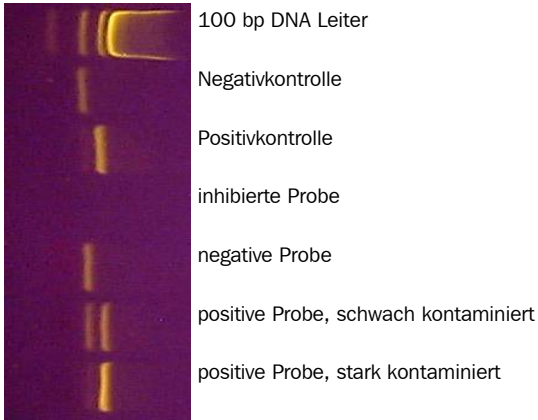
Interpretation möglicher Bandenmuster der Proben:

Bandenmuster	Interpretation
Bande bei 191 bp	negative Probe
Bande bei ca. 270 bp, mit zusätzlicher Bande bei 191 bp	positive Probe mit schwacher Kontamination
starke Bande bei ca. 270 bp	positive Probe mit starker Kontamination
keine Bande	- Inhibition der PCR durch Bestandteile in der Probe - Aktivität der Polymerase nicht ausreichend

Vereinzelt kann es zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen, die als schwache, meist diffuse Banden unterschiedlicher Größen im Gel sichtbar werden. Diese Banden, hervorgerufen durch unspezifisches Annealing, bedeuten keine Kontamination, solange sie nicht die oben angegebenen Größen aufweisen. Primerdimere können eine diffuse Bande bei 80-90 bp bilden.

Bei ersichtlicher Inhibition der PCR durch die Probe muss eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen Extraktionskit durchgeführt und die Probe erneut getestet werden. Im Anhang finden Sie eine Liste von DNA-Extraktionskits, die mit diesem PCR-Kit validiert wurden.

Abbildung 1: Ergebnis der Gelelektrophorese



#### 4. Fehleranalyse

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

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend
- Kontroll-DNA enthaltende Röhrchen wurden vor Rehydratisierung nicht herunterzentrifugiert
- Programmierfehler
- Pipettierfehler

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 1.3 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.

1. Reagents and Materials

1.1 Kit Components

Test Reaction Tubes tubes pre-coated with lyophilized primers, dNTPs, internal control DNA, and gel loading buffer/dye	3, 6, 12, or 30 strips of 8 transparent tubes each, depending on package size
Positive Control Reaction Tubes Test Reaction Tubes containing DNA-fragments of <i>Mycoplasma orale</i> genome	1, 2, 3, or 5 strips of 8 red tubes each, depending on package size
Caps for PCR Tubes	4, 6, 15, or 35 strips of 8 tubes each, depending on package size
Rehydration Buffer	1.6 ml

1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2 to +8 °C. The kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate (online: <http://www.minerva-biolabs.com/>) or the product box.

1.3 Supplemental Requirements

PCR thermal cycler  
agarose gel electrophoresis apparatus  
micro centrifuge, micropipettes and filtered tips  
polymerase

The test provides excellent results with MB *Taq* DNA Polymerase (Cat # 53-0050/0100/0200/0250). 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 Advance utilizes the polymerase chain reaction (PCR), which was established as the method of choice for highest sensitivity in the detection of *Mycoplasma* and *Acholeplasma* contamination in cell cultures and other cell culture derived biologicals. Detection requires as little as 1 to 5 fg of mycoplasma DNA corresponding to 2-5 mycoplasma per sample volume. The primer set is specific to the highly conserved rRNA operon, or more specifically, the 16S rRNA coding region in the mycoplasma genome. This allows for detection of *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, usually encountered as contaminants in cell cultures, but also *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* and *Ureaplasma* species. 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 Venor®GeM Advance: *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus pneumoniae*. Furthermore there is no positive signal with human DNA as template.

Because the reaction tubes included with the kit are pre-coated with appropriate dNTPs and primers, the total assay time is greatly reduced compared to general protocols that require individual loading of reaction tubes. After thermal cycling the PCR can be loaded directly on the agarose gel.

Venor®GeM Advance also contains internal control DNA in the PCR mix. When running the PCR a successfully performed reaction is indicated by a 191 bp band on the agarose gel.



**Venor®GeM Advance is intended for research use only. Not for clinical diagnostics or testing of human samples.**

## 3. Test Protocol

### 3.1 Preparation of Sample Material

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

**3.2 Thermal Profile**

The programming process of your cycler is explained in the manual of the instrument.

**Program**

- |           |                  |
|-----------|------------------|
| 1 cycle   | 94 °C for 2 min  |
| 39 cycles | 94 °C for 30 sec |
|           | 55 °C for 30 sec |
|           | 72 °C for 30 sec |



**The incubation time depends on the polymerase used. Some hot start enzymes need to be activated at 94 °C for more than 2 minutes. Please see polymerase data sheet for duration.**

cool down to 4 °C to 8 °C

**3.3 PCR Setup**

1. Mix Rehydration Buffer and Polymerase

For optimal comparison of all samples tested the polymerase should not be added separately to the PCR tubes but premixed with the Rehydration Buffer.

Determine the total number of reactions including negative and positive controls. Calculate the required amount of Rehydration Buffer and Polymerase (1 unit/reaction) including an additional reaction (23 µl) to compensate for pipetting losses:

	Test Reaction	Negative Control	Positive Control
Rehydration Buffer	22.8 $\mu$ l	22.8 $\mu$ l	24.8 $\mu$ l
Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l

For other polymerase concentrations the amount of water needs to be adjusted.

Vortex the Rehydration Buffer vigorously (at least 30 sec), transfer the calculated amount into a fresh minicentrifuge tube and add the required amount of polymerase. Mix the Rehydration Buffer/Polymerase Mix by flicking the tube.



**Do not vortex diluted polymerase.**

## 2. Rehydration of PCR reagents

Remove and cut off the required amount of Test Reaction Tubes (transparent) and Positive Control Tubes (red) from the bag. Replace remaining tubes in bag and seal properly. Label tubes as appropriate. Zentrifuge or tip the tubes on the table to collect the lyophilized material at the bottom of the tube. Peel off protective film from tubes. Aliquot 23  $\mu$ l of the prepared Rehydration Buffer/Polymerase Mix into each PCR reaction tube. Rehydrate Positive Control Tubes with 25  $\mu$ l of the mix.



**Avoid cross contamination by preparing the Positive Controls after finishing the Negative Controls and Test Reactions.**

## 3. Sample addition

The total volume per reaction is 25  $\mu$ l. Add the corresponding sample material directly to the PCR tubes:

Negative Control: 2  $\mu$ l of deionized water or elution buffer if extraction kit used

Test Reaction: 2  $\mu$ l of sample

Positive Control: no sample required

Close tubes with Caps for PCR Tubes included in kit. Mix contents of each tube thoroughly by flicking tubes. Do not vortex! Collect liquid contents at the bottom of the PCR tube by brief centrifugation. Incubate at room temperature for 5 minutes. Proceed immediately to thermal cycling.

3.4 Agarose Gel Run

Prepare a 1.5% standard agarose gel, approx. 5 mm thick, with a 5 mm-comb.  
Load 5 µl of each PCR reaction. No loading buffer and running dye are required.  
Stop electrophoresis after 2 cm run distance (depending on the electrophoresis chamber used e.g. run for 20 minutes at 100 V).

3.5 Gel Evaluation

A distinct 191 bp band should appear in every lane indicating a successfully performed PCR. This band may fade out with increased amounts of amplicons formed, caused by mycoplasma DNA loads of > 5x10<sup>6</sup> copies/ml. The initial concentration of positive control DNA exceeds 5x10<sup>6</sup> copies/ml in order to account for DNA loss resulting from repeated freezing and thawing.

Relevant amplicon sizes:

Internal control	191 bp
<i>Mycoplasma spp.</i> (see table in the appendix)	265-278 bp

Controls:

negative control	band at 191 bp
positive control	band at 267 bp , possibly an additional band at 191 bp

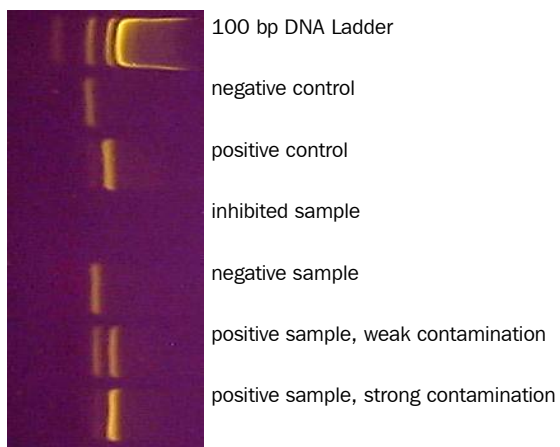
Interpretation of Test Reaction band patterns:

Band pattern	Interpretation
band at 191 bp	negative sample
band at 270 bp and at 191 bp	mycoplasma-positive sample with weak contamination
strong band at 270 bp	mycoplasma-positive sample, highly contaminated
no band	PCR inhibition or activity of polymerase is insufficient

With Venor®GeM designed for high sensitivity and therefore prone to nonspecific annealing, bands of various length that are less intensive can be produced, but do not indicate positive results. Possible primer self-annealing produces another band of 80-90 bp in length, but also does not affect the precision or results of the test.

If the PCR of a sample is inhibited, PCR inhibitors can easily be removed from the sample by performing a DNA extraction with a commercially available kit. A list of recommended DNA extraction kits is provided in the appendix.

Figure 1: Amplicon pattern



#### 4. Trouble Shooting

No amplification of control DNA may be due to the following reasons:

- activity of polymerase is insufficient
- control DNA tubes have not been spun down before rehydration
- programming mistake
- pipetting mistake

Before rerun of a negative and a positive control please check thermocycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1.3. The enzyme concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

## Appendix

### Detection Range and Sizes of Amplicons

No.	species	amplicon size (bp)
1	<i>Mycoplasma orale</i> <sup>1,2</sup>	266
2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <sup>2</sup>	273
3	<i>Mycoplasma penetrans</i>	274
4	<i>Mycoplasma pirum</i>	274
5	<i>Acholeplasma laidlawii</i> <sup>2</sup>	273
6	<i>Mycoplasma fermentans</i>	267
7	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	273
8	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> <sup>2</sup>	268
9	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	268
10	<i>Mycoplasma falconis</i>	268
11	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	267
12	<i>Mycoplasma arginini</i>	267
13	<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	267
14	<i>Mycoplasma opalescens</i>	266
15	<i>Mycoplasma primum</i>	267
16	<i>Mycoplasma maculosum</i>	267
17	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
18	<i>Mycoplasma cloacale</i>	266
19	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	265
20	<i>Mycoplasma synoviae</i> <sup>2</sup>	266
21	<i>Mycoplasma salivarium</i>	266
22	<i>Mycoplasma faucium</i>	265
23	<i>Mycoplasma hominis</i>	266
24	<i>Mycoplasma genitalium</i>	273
25	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	267
26	<i>Mycoplasma sp. ovine/caprine</i>	267
27	<i>Mycoplasma agalactica</i>	267
28	<i>Mycoplasma timone</i>	266

<sup>1</sup> provided as positive control DNA

<sup>2</sup> Test strain according to European Pharmacopoeia 2.6.7. Mycoplasmas

### 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.

### <sup>§</sup>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.

### Trademarks

Venor, Onar and Mycoplasma Off are registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH, Germany.

## Related Products

### Polymerases

53-0050/0100/0200/0250	MB Taq DNA Polymerase	50/100/200/250 units
54-0100/0500	EUB Polymerase, DNA-free	100/500 units

### Diagnostic Kits for conventional PCR

11-1025/050/100/250	Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection Kit	25/50/100/250 tests
11-7024/048/096/240	Venor®GeM Advance Mycoplasma PCR Detection Kit	24/48/096/240 tests
12-1025/1050/1100/1250	Onar®EUB Eubacteria Detection Kit	25/50/100/250 tests

### Diagnostic Kits for real-time 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
10-0200/0500/1000	Mynox®Gold Mycoplasma Elimination Reagent	2/5/10 treatments

### Genomic DNA Extracts 100 µl each, approx. 10 ng / 100 µl

51-1723	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , NC 001723
51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
51-0792	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , DSMZ 792
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , SMZ 5571
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>M. hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>M. orale</i> , NC 010112
51-0113	<i>M. salivarium</i> , NC 010113
51-0115	<i>M. gallisepticum</i> , NC 010115
51-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> , NC 010116
51-0117	<i>M. fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>M. pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>M. arginini</i> , NC 010129
51-0130	<i>M. hyorhinis</i> , NC 010130
51-0162	<i>M. arthritis</i> , NC 010162
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>M. penetrans</i> , NC 11746

### Quantification Standard 100 µl each, 1x10<sup>6</sup> genomes/µl

52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i> DNA Standard
52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> DNA Standard
52-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> DNA Standard
52-0130	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> DNA Standard

### Zell Shield™

13-0050/0150	Cell Culture Contamination Preventive Reagent, 100 x	50/3 x 50 ml
13-0150		

### Mycoplasma Off®

15-1000	Surface Disinfectant Spray, spray bottle	1000 ml
15-5000	Surface Disinfectant Spray, refill bottles	5 x 1000 ml

### DNA Remover™

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

