

Nachweis von Mykoplasmen mit Venor® GeM Advance: Anwendung im Detail

Information der Biochrom AG

Venor® GeM Advance ist eine Weiterentwicklung des Venor® GeM Detektionskits für die Gelauswertung. Der Kit enthält vorbereitete PCR-Gefäße mit allen notwendigen Reagenzien: Einfach mit Rehydratisierungspuffer und Polymerase lösen, Probe dazu – und ab in den Cycler!

Im Vergleich zum herkömmlichen Testverfahren entfällt der zeitaufwändige Schritt, zunächst einen Mastermix herzustellen und diesen auf die PCR-Gefäße zu verteilen. Dadurch reduzieren sich beim Venor® GeM Advance deutlich Fehleranfälligkeit und Arbeitsaufwand. Der Ansatz enthält auch den Gelladepuffer, so dass direkt aus dem PCR-Ansatz das Gel beladen werden kann.

1 Testprinzip

Venor® GeM basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche als bewährte Methode für höchste Sensivität beim Nachweis von Mykoplasma- und Acholeplasmakontaminationen in Zellkulturen und anderen biologischen Materialien gilt. Die Primer sind für einen Abschnitt der hoch konservierten 16s rRNA-Region im Mykoplasmen genom spezifisch. Diese erlauben den Nachweis aller Mykoplasma-Arten, die gewöhnlich als Kontamination in der Zellkultur auftreten. Der Mastermix enthält zudem eine interne DNA-Kontrolle, um fehlerhafte oder inhibierte PCR-Ansätze detektieren zu können und zeigt so falsch-negative zuverlässig an. Als Positivkontrolle enthält der Kit zusätzlich vorgefertigte PCR-Gefäße mit DNA von *Mycoplasma orale*.

Wir empfehlen, Venor® GeM Advance mit der zuverlässigen MB Taq DNA Polymerase anzuwenden (Kat. Nr. W 53-0050/0100/0200/0250). Nur mit dieser Polymerase können wir Ihnen optimale Ergebnisse garantieren.

2 Reagenzien und Materialien

2.1 Inhalt der Packung

- | | |
|--|---|
| ➤ Testansätze:
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:
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: | Streifen mit transparenten bzw. roten Deckeln für PCR-Gefäße |
| ➤ Rehydratisierungspuffer | 1,6 ml |

2.2 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 auf der Verpackung angegebenen Datum haltbar.

2.3 Benötigte Geräte und Materialien

Sie benötigen einen PCR-Thermocycler mit Deckelheizung, alle Modelle sind geeignet. Weiterhin nötig: DNA-Elektrophoreseapparatur, Materialien zur Agarosegel-Elektrophorese, Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten, Filterspitzen, DNA Polymerase



Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit der MB Taq DNA Polymerase (Kat. Nr. W 53-0050; W 53-0100; W 53-0200; W 53-0250).

Hinweis: Bei der Verwendung anderer Polymerasen mit diesem Kit können wir weder hohe Sensitivität noch Kompatibilität garantieren. Sollten Sie die 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.

3 Anwendungsgebiete und Testprinzip im Detail

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 1-5 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. hyorhinitis*, *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.

4 Durchführung

4.1 Gewinnung des Probenmaterials

Zellkulturen sollten bei 90-100 % 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 Kontrollen bei der Analyse der PCR angezeigt. Gegebenenfalls ist dann eine DNA-Extraktion durchzuführen (s.u.). Im Zellkulturmedium enthaltenes Penicillin und Streptomycin hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Mykoplasmen oder die Sensitivität des Tests. Zellkulturüberstände sind für die Testung besonders gut geeignet. Auch wenn einzelne Mykoplasmenarten 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 h vor Testung sollte eine Hitzeinaktivierung wie unten beschrieben durchgeführt werden.

Inhibierende Zellkulturüberstände wie auch Zellen, Gewebeextrakte, Kryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte können nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden. 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 g)

4. Der Überstand wird direkt in die PCR eingesetzt. Alternativ kann ein kommerziell erhältlicher DNA Extraktionskit 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 10000 g oder 6 min bei 13000 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 h. Die DNA-Konzentration der Proben sollte 100 µg/ml nicht überschreiten.

4.2 Programmierung des Thermocyclers

Die Durchführung der Programmierung des 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 4-8 °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.

4.3 PCR-Ansatz

1. Rehydratisierungspuffer 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 U/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 sec), berechnete Menge mit der entsprechenden Menge an Polymerase in einem sauberen Reaktionsgefäß durch Anschneiden 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 Anschneiden gemischt, kurz zentrifugiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in den Block des PCR-Cyclers gestellt und das Cyclerprogramm gestartet.

4.4 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)

4.5 Gelauswertung

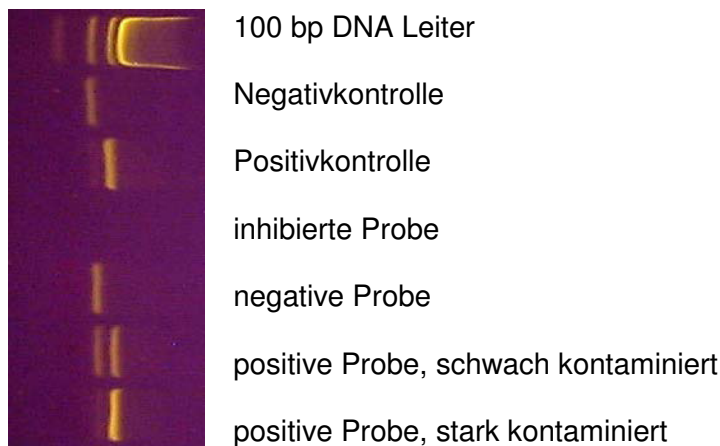
Eine fehlerfreie PCR wird durch eine Bande bei 191 bp angezeigt. Bei Zunahme der Konzentration an Mykoplasmen-DNA ($> 5 \times 10^6$ Partikel/ml) nimmt die Intensität der Internen Kontrolle durch die übermäßige Bildung des Mykoplasmen-Amplikons ab.

- Relevante Amplikongrößen:
 - Interne Kontrolle 191 bp
 - Mycoplasma spp.* 265-278 bp
 - (siehe auch Liste im Anhang)
- Kontrollergebnisse:
 - Negativkontrolle Bande bei 191 bp
 - Positivkontrolle Bande bei 267 bp, 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	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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.



5 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 2.3 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.

6 Details von Venor® GeM Advance

Parameter	Venor® GeM Advance			
Kat. Nr.	W 11-7024	W 11-7048	W 11-7096	W 11-7240
Einheiten	24 Tests	48 Tests	96 Tests	240 Tests
Lagerung	+2 - +8 °C			
Bestandteile	<ul style="list-style-type: none">➤ Primer/Nukleotide Mix, Gelladepuffer, interne Kontroll-DNA in PCR-Gefäßen➤ Rehydratisierungspuffer➤ Positive Kontroll-DNA ohne MB <i>Taq</i> DNA Polymerase			
Anwendung	Mykoplasma Detektion			
Hinweis	Für die <i>in vitro</i> Anwendung			

Produkte für die Mykoplasmadetektion und MB *Taq* DNA Polymerase:
<http://www.biochrom.de/produkte/mykoplasmen-reagenzien/>

Anhang

Detection Range and Sizes of Amplicons

No. species	amplicon size (bp)
1 <i>Mycoplasma orale</i> ^{1,2}	266
2 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ²	273
3 <i>Mycoplasma penetrans</i>	274
4 <i>Mycoplasma pirum</i>	274
5 <i>Acholeplasma laidlawii</i> ²	273
6 <i>Mycoplasma fermentans</i>	267
7 <i>Ureaplasma urealyticum</i>	273
8 <i>Mycoplasma hyorhinis</i> ²	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> ²	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

¹ provided as positive control DNA

² test strain according to European Pharmacopoeia 2.6.7. Mycoplasma