

Nachweis von Mykoplasmen mit Venor® GeM: Anwendung im Detail

Information der Biochrom AG

Venor® GeM ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest für den *in vitro*-Nachweis von Mykoplasmen. Der Venor® GeM PCR-Kit ermöglicht den qualitativen oder schnellen quantitativen Nachweis von Mykoplasmen und Acholeplasmen in Zellkulturen und biologischem Probenmaterial. Der Kit zeichnet sich durch seine Zuverlässigkeit und einfache Handhabung aus.

Der Venor® GeM-Kit enthält keine Polymerase. Die Biochrom AG empfiehlt daher, den Test mit der zuverlässigen hot-start MB Taq DNA Polymerase (Kat. Nr. W 53-0200) durchzuführen. Nur mit dieser Polymerase können optimale Ergebnisse garantiert werden.

1 Testprinzip

Der Venor® GeM-Mykoplasmen-Detektionskit (Kat. Nr. W 11-1025/1050/1100/1250) 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 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 Mykoplasma hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit Venor® GeM 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.

Das Testsystem beinhaltet außerdem eine interne Kontrolle, welche im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 191 bp großes Produkt, welches im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe erscheint.

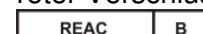
Die Biochrom AG empfiehlt, Venor® GeM mit der zuverlässigen MB Taq DNA Polymerase anzuwenden (Kat. Nr. W 53-0050/0100/0200/0250). Nur mit dieser Polymerase können optimale Ergebnisse garantiert werden.

2 Reagenzien und Materialien

2.1 Inhalt der Packung

- *Primer/Nucleotide Mix:*
Primer und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP; portioniert für 25 Tests (im Freekit für 5 Tests), lyophilisiert

roter Verschluss:



- *PCR 10x Reaction Buffer:*
Reaktionspuffer, 500 µl
- *Positive control DNA:*
DNA-Fragmente des Mycoplasma orale-Genoms,
mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert
- *Internal control DNA:*
Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert
- *PCR grade Water:*
deionisiertes, DNA-freies Wasser für die Komponenten-
aufnahme und die PCR-Reaktion, 2 ml

blauer Verschluss:



grüner Verschluss:



gelber Verschluss:



weißer Verschluss:



2.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen, *Primer/Probe/Nucleotide Mix* und die *Internal Control* nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Garantie Certificate angegebenen Datum haltbar.

2.3 Benötigte Geräte und Materialien

- PCR-Thermocycler mit Deckelheizung, alle Modelle geeignet (PCR-Thermocycler und Mineralöl bei Verwendung eines Thermocyclers ohne Heizdeckel)
- PCR-Reaktionsgefäße
- DNA-Elektrophoreseapparatur und Materialien zur Agarosegel-Elektrophorese
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen
- DNA-Polymerase



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

Hinweis: Bei der Verwendung anderer Polymerasen können weder hohe Sensitivität noch Kompatibilität garantiert werden. 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.



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

3 Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Zellkulturen sollten bei 90-100 % Konfluenz getestet werden. Bei überalterten Kulturen kann es zur Anreicherung von Inhibitoren der PCR im Kulturmedium kommen, ggf. ist eine DNA-Extraktion durchzuführen. Im Zellkulturmedium enthaltenes Penicillin oder Streptomycin hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Mykoplasmen oder die Sensitivität des Tests. Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

Zellkulturüberstände sind für die Testung besonders gut geeignet. Zellen sollten nicht in die Probe eingebracht werden, da sie die PCR-Reaktion inhibieren können. Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca. 10^6 Mykoplasmen/ml. Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung. Zellen können aber wie auch Gewebeextrakte, Kryokulturen, fötales Kälberserum, Impfstoffe oder Paraffin-Schnitte nach einer geeigneten DNA-Extraktion getestet werden.

Die PCR-Probe wird durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen werden lysiert und DNAsen inaktiviert. Durch Zentrifugation werden störende Zelltrümmer abgetrennt.

Vorgehen:

1. 100 µl Probenmaterial, z.B. Zellkulturüberstand, in steriles Reaktionsgefäß geben, dicht verschließen
2. 5 Minuten kochen, Vorsicht: Deckel kann sich öffnen und Aerosole können entstehen
3. für 5 Sekunden bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugieren
4. 2 µl des Überstandes für den PCR-Test einsetzen, Probe ist für ca. 2 Wochen bei +2 °C bis +8 °C stabil.

3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugieren
2. Zugabe von deionisiertem, DNA-freiem Wasser (Röhrchen mit weißem Deckel)
 - Primer/Nucleotide Mix (für max. 25 Reaktionen): 65 µl
 - **Probekit:** Primer/Nucleotide Mix (für max. 5 Reaktionen): 15 µl
 - *Positive Control DNA:* 300 µl
 - *Internal Control DNA:* 300 µl
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. kurz vortexen, erneut für 5 Sekunden bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugieren



Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien auf Eis gehalten und bei mindestens -18 °C gelagert werden.

3.3 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 °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.

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25 µl. Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt werden. Der Mastermix wird in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

Pipettierschema:

| | für 1 Reaktion | für 5 Reaktionen* | für 25 Reaktionen |
|---|----------------|-------------------|-------------------|
| <i>PCR grade Water</i> (weißer Deckel) | 15,3 µl | 76,5 µl | 382,5 µl |
| <i>10x Reaction Buffer</i> (blauer Deckel) | 2,5 µl | 12,5 µl | 62,5 µl |
| <i>Primer/Nucleotide Mix</i> (roter Deckel) | 2,5 µl | 12,5 µl | 62,5 µl |
| <i>Internal Control DNA</i> (gelber Deckel) | 2,5 µl | 12,5 µl | 62,5 µl |
| Polymerase (5 U/µl) | 0,2 µl | 1,0 µl | 5,0 µl |

*entspricht dem Inhalt eines Primer/Nucleotide Mix-Röhrchens des Probekits

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.

Der Mastermix wird á 23 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 2 µl deionisiertem Wasser (Röhrchen mit weißem Deckel) oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 2 µl Probe oder 2 µl Positivkontrolle (Röhrchen mit grünem Deckel) versetzt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Block des PCR-Cyclers gestellt und das Cyclerprogramm gestartet.

3.5 Agarosegel-Lauf

- 1,5 %iges Standard-Agarosegel, ca. 5 mm dick, mit 5 mm-Kamm

- 5 µl jedes PCR-Reaktionsansatzes, gemischt mit Brom-Phenolblau-Ladepuffer, pro Bahn auftragen (es sollte nur Brom-Phenolblau in geringer Konzentration als Laufmarker verwendet werden)
- Elektrophorese nach 2 cm Wegstrecke stoppen (je nach Elektrophoresekammer z.B. nach 20 Minuten bei 100 V)

3.6 Gelauswertung

Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR 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, aber auch zusätzliche Bande bei 191 bp möglich

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.

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.

Abb. 1: Ergebnis der Gelelektrophorese



100 bp DNA Leiter

Negativkontrolle

Positivkontrolle

inhibierte Probe

negative Probe

positive Probe, schwach kontaminiert

positive Probe, stark kontaminiert

4 Details für Venor® GeM

| Parameter | Venor® GeM | | | |
|--------------|---|-----------|-----------|-----------|
| Kat. Nr. | W 11-1025 | W 11-1050 | W 11-1100 | W 11-1250 |
| Einheiten | 25 Tests | 50 Tests | 100 Tests | 250 Tests |
| Lagerung | +2 - +8 °C | | | |
| Bestandteile | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Primer/Nukleotide Mix ➤ PCR 10x Reaktionspuffer ➤ Positive Kontroll-DNA ➤ Interne Kontroll-DNA ➤ Wasser in PCR Qualität ohne MB <i>Taq</i> DNA Polymerase | | | |
| Anwendung | Mykoplasma Detektion | | | |
| Hinweis | Für die <i>in vitro</i> Anwendung | | | |

Produkte für die Detektion von Mykoplasmen von der Biochrom AG:

<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 primatum</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. Mycoplasmas