

Nachweis von Mykoplasmen mit Venor® *GeM-qEP*: Anwendung im Detail

Information der Biochrom AG

Venor® *GeM-qEP* ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest für den *in vitro*-Nachweis von Mykoplasmen. Venor® *GeM-qEP* ist ein PCR Kit für den sensitiven und sicheren Mykoplasmen-DNA Nachweis in Forschung, industrieller Anwendung und Produkttestung. Das Assay eignet sich für die Direkttestung von Zellkulturen und biologischem Material in Kombination mit Zellkulturanreicherung.

Wir empfehlen ausdrücklich Venor® *GeM-qEP* mit unserer zuverlässigen hot-start MB *Taq* DNA Polymerase (Kat. Nr. W-53-0200) durchzuführen. Nur mit dieser Polymerase können wir Ihnen optimale Ergebnisse garantieren.

1 Testprinzip

Der Venor® *GeM-qEP* Mykoplasmen-Detektionskit ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Die qPCR-Methode erlaubt eine sehr schnelle und online verfolgbare Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Der Test wurde in Anlehnung an die „European Pharmacopoeia“ mit unterschiedlichem Probenmaterial (Chondrozytenpräparate, Seren, Überstände permanente Zellkulturen, usw.) validiert. Dabei wurde das in der European Pharmacopoeia 2.6.7 beschriebene Direkt-nachweis- und Anreicherungsverfahren auf Zellkulturen angewendet. Der Kit enthält drei verschiedene Primer/Probe/Nucleotide Mixe mit FAM-markierten Scorpion-Sonden unterschiedlicher Spezifität. Der *Mycoplasma spp.* Mix detektiert verschiedene Mykoplasmen (siehe Tabelle), der *Mycoplasma pneumoniae* Mix detektiert *Mycoplasma pneumoniae* und der *Acholeplasma laidlawii* Mix ist spezifisch für *Acholeplasma laidlawii*. Zur Analyse einer Probe werden drei verschiedene Mastermixe hergestellt.



Ein Mastermix enthält nur einen der drei Primer/Probe/Nucleotide Mixe. Die Mixe dürfen nicht gemischt werden, da dies zu Sensitivitätsverlusten der PCR führt.

Das Testsystem beinhaltet eine Interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt wird. Diese wird bei einer erfolgreich durchgeführten PCR mit einer weiteren spezifischen Sonde detektiert. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse z.B. durch Inhibition der PCR durch die Probenmatrix ausgeschlossen werden.

Der Primer/Probe/Nucleotide Mix enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Durch die Verwendung des hitzelabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz kann ein Verschleppen früherer PCR-Produkte in den neuen Reaktionsansatz vermieden werden. Dazu muss in vorangegangenen PCR-Ansätzen dTTP gegen dUTP ausgetauscht worden sein und eine Behandlung der neuen Ansätze mit UNG erfolgen. Dabei werden unerwünschte PCR-Vorlagen an den UTPs gespalten und im anschließenden Denaturierungsschritt hydrolysiert. Gleichzeitig wird das Enzym durch die Hitze inaktiviert. Native DNA wird nicht abgebaut, da es kein Uracil enthält. UNG ist nicht Bestandteil von Venor® *GeM-qEP*.

1.1 Spezifität

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, murine DNA und weitere bakterielle DNA (*Legionella sp.*, *Chlamydomphila sp.*, *Bordetella sp.* etc.) werden nicht detektiert. In der folgenden Tabelle sind die detektierbaren Spezies aufgelistet.

Detektierbare Spezies:

<i>A. laidlawii</i> *	<i>M. cloacale</i>	<i>M. glycyphilum</i>	<i>M. pneumoniae</i> *
<i>M. agalactiae</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. pulmonis</i>
<i>M. agassizii</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. salivarium</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. simbae</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. sp.ovine/caprine</i>
<i>M. arginini</i>	<i>M. cricetuli</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. spermatophilum</i>
<i>M. arthritis</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. sualvi</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. faucium</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. synoviae</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. canadense</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. timone</i>
<i>M. capricolum</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. turnidae</i>
<i>M. caviae</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. verecundum</i>
<i>M. citelli</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. opalescens</i>	<i>M. zalophi</i>
	<i>M. gateae</i>	<i>M. orale</i>	

*Detektion mit dem entsprechenden Primer/Probe/Nucleotide Mix

1.2 Sensitivität

Der positive Cut-Off point (Genomkopien/PCR) wurde für die drei Sonden anhand von verschiedenen Spezies bestimmt:

<i>Mycoplasma spp.</i> Mix:	12,5 GK/PCR für <i>M. fermentans</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. arginini</i> , ect.
<i>A. laidlawii</i> Mix:	8 GK/PCR für <i>A. laidlawii</i>
<i>M. pneumoniae</i> Mix:	50 GK/PCR für <i>M. pneumoniae</i>

2 Reagenzien und Materialien

2.1 Inhalt der Packung

- *Primer/Probe/Nucleotide mix mycoplasma spp.*
Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25
Tests, lyophilisiert

roter Verschluss:

REAC	B
------	---

- *Primer/Probe/Nucleotide mix mycoplasma pneumoniae*
Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25
Tests, lyophilisiert
weisser Verschluss:

REAC	G
------	---
- *Primer/Probe/Nucleotide mix acholeplasma laidlawii*
Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate
dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25
Tests, lyophilisiert
schwarzer Verschluss:

REAC	F
------	---
- *Rehydration buffer*
Rehydratisierungspuffer, 1,8 ml
blauer Verschluss:

REAC	A
------	---
- *Positive control DNA*
DNA-Fragmente des *M. orale*, *A. Laidlawii* und
M. Pneumoniae-Genoms, mittels PCR hergestellt,
nicht infektiös, lyophilisiert
grüner Verschluss:

CONTROL	+
---------	---
- *Internal control DNA*
Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert
gelber Verschluss:

CONTROL	i
---------	---
- *PCR-grade water*
Wasser zur Rehydratisierung der Komponenten
und zur Herstellung des Mastermixes
weisser Verschluss:

REAC	H
------	---

2.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden gekühlt versendet und bei +2 °C - +8 °C aufbewahrt. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien nach Resuspension sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und die Primer/Probe/Nucleotide Mixe nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat angegebenen Datum haltbar.

2.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät
- geeignete PCR Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1-1000 µl)
- MB *Taq* DNA Polymerase (1 Unit/Test)



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

Hinweis:

Bei der Verwendung anderer Polymerasen mit dem Kit kann 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. Bei der Verwendung anderer Polymerasen muss eventuell der Polymerase-spezifische Reaktionspuffer verwendet 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 internen Kontrollen bei der Analyse der PCR angezeigt. Gegebenenfalls ist dann eine DNA-Extraktion durchzuführen. 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. 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.

Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung. Die Probe wird durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen werden lysiert und DNA-sen inaktiviert.

Inhibierte Proben (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 einem DNA-Extraktionskit. 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. Desweiteren können durch Extraktion Farbstoffe aus dem Probenmaterial entfernt werden. Farbstoffe wie Phenolrot (Analysen zeigten keine Veränderung der Fluoreszenzmessung mit Standard-Phenolrotkonzentrationen im Zellkulturüberstand bei einem Probenvolumen von 2 µl) können die Fluoreszenzmessung beeinflussen. 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 sek, 1000xg)

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 10.000xg oder 6 min bei 13.000xg
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 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl Rehydrationspuffer zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von DNA-freiem Wasser (im Kit enthalten)
 - Positive Control DNA* 300 µl
 - Internal Control DNA* 300 µl
4. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

3.3 Programmierung und Auswertung

3.3.1 *LightCycler*[®] 1.2, 1.5 und 2.0



***LightCycler*[®] 2.0:**
Bitte achten Sie bei der Programmierung auf die Einstellung der „Seek Temperature“, diese sollte auf mindestens 90 °C eingestellt sein.

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen 1
Analysemodus None

Temperaturprofil (°C)	Segment 1
Zieltempertur (°C)	95
Inkubationszeit (min)	2:00
Temperaturanstiegsrate (°C/s)	20.0
zweite Zieltemperatur (°C)	0
Temperaturschritte (°C)	0.0
Verzögerung (Zyklen)	0
Fluoreszenzmessung	None

Eine Anleitung zur Programmierung des *LightCycler*[®] 480 kann bei uns angefordert werden.

Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45
Analysemodus Quantification

Temperaturprofil (°C)	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
Zieltempertur (°C)	95	55	60	72
Inkubationszeit (s)	0	5	7	5
Temperaturanstiegsrate (°C/s)	20.0	20.0	20.0	20.0
zweite Zieltemperatur (°C)	0	0	0	0
Temperaturschritte (°C)	0.0	0.0	0.0	0.0
Verzögerung (Zyklen)	0	0	0	0
Fluoreszenzmessung	None	None	Single	None



Segment 3 darf nicht weggelassen werden!

Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen 1
Analysemodus None

Temperaturprofil (°C)	Segment 1
Zieltempertur (°C)	40
Inkubationszeit (s)	30
Temperaturanstiegsrate (°C/s)	20.0
zweite Zieltemperatur (°C)	0
Temperaturschritte (°C)	0.0
Verzögerung (Zyklen)	0
Fluoreszenzmessung	None

Auswertung der Rohdaten :

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3.
- Zur Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

Target	Mycoplasmen	Interne Kontrolle
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)

3.3.1 Rotorgene 6000 (5-plex)

Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min



**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes
Auf die korrekte Filterauswahl:**

**Target Mycoplasmen: Green (470-510 nm)
Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)**

Programmschritt 2: Amplifikation

Einstellung	Cycling
Zyklen	45
Denaturierung	95 °C für 5 sek
Annealing	55 °C für 10 sek → Datenerfassung (Filter Grün und Orange)
Extension	72 °C für 7 sek
Gain	automatisch (auto Gain)
Slope Correct	aktiviert
Ignore First	deaktiviert

Target	Mycoplasmen	Interne Kontrolle
Kanal	Grün	Orange

Auswertung der Rohdaten:

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:
 - Quantitation Analysis - Cycling A* (green oder orange)
 - Quant. Results - Cycling A* (green oder orange)
 - Standard Curve - Cycling A* (green oder orange)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *linear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold (entfällt, wenn eine Standardreihe mitgeführt und Autothreshold angewählt wurde)
 - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
 - Thresholdlinie in Grafik plazieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25 µl. Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden.

Pipettierschema:

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
Wasser (weißer Deckel)	8,0 µl	200,0 µl
Primer/Probe/Nucleotide Mix*	14,0 µl	350,0 µl
Internal Control DNA (gelber Deckel)	1,0 µl	25,0 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	5,0 µl

+ Template DNA/ NK oder PK 2,0 µl

* (roter, weißer oder schwarzer Deckel)



Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 60 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.

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

Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

3.5 Interpretation der Ergebnisse

Mycoplasmen PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	irrelevant	Mycoplasmen positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	Mycoplasmen negativ

Die Präsenz von Mycoplasmen in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals für Mycoplasmen angezeigt. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an Mycoplasmen in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Kanal für Mycoplasmen erkennbar.

4 Fehleranalyse

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 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.

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

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend oder Enzym nicht kompatibel mit Kitpuffer
- Programmierfehler
- Pipettierfehler
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

5. Gerätekompatibilität

Gerät	Typ 1	Typ 2
LightCycler [®] 1.2	+v	-
LightCycler [®] 1.5	+	-
LightCycler [®] 2.0	+	o
LightCycler [®] 480	+	o
Rotorgene 3000	+	o
Rotorgene 6000 (5-plex)	+v	o
ABI Prism [®] 7000	-	+
ABI Prism [®] 7300	-	+
ABI Prism [®] 7500	-	+v
ABI Prism [®] 7700	-	+
ABI Prism [®] 7900	-	+
iCycler iQ [®]	o	o
iQ [™] 5	o	o

+ = empfohlene Kit-Variante

- = Detektion der internen Kontrolle nicht möglich

o = nicht getestet, aber Kompatibilität zu erwarten

V = validiert

6 Details für Venor[®] GeM-qEP

Parameter	Venor [®] GeM-qEP		
Kat. Nr.	W 11-4025	W 11-4100	W 11-4250
Einheiten	25 Tests	100 Tests	250 Tests
Lagerung	-18 °C		
Bestandteile	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primer/Probe/Nukleotide Mix <i>mycoplasma spp.</i> ➤ Primer/Probe/Nukleotide Mix <i>mycoplasma pneumoniae</i> ➤ Primer/Probe/Nukleotide Mix <i>acholeplasma laidlawii</i> ➤ rehydratisierungspuffer ➤ Positive Kontroll DNA ➤ Internal Kontroll DNA ➤ Wasser in PCR-Qualität ohne MB <i>Taq</i> DNA Polymerase 		
Anwendung	Mykoplasmadetektion		
Hinweis	Für die <i>in vitro</i> Anwendung		

Produkte zur Mykoplasmandetektion und MB *Taq* DNA Polymerase:

<http://www.biochrom.de/produkte/mykoplasmen-reagenzien/>