

e-Myco™ VALiD-Q Mycoplasma qPCR Detection Kit

[RUO] Exclusiv pentru cercetare

[REF] 25245



INTRODUCERE

Mycoplasma sunt organisme prokariote mici, rotunde sau filamentoase, ce contaminează frecvent culturile celulare. Mycoplasma depind de gazdele lor pentru mulți nutrienți, din cauza capacității lor limitate de biosinteză. Până la 30–85% din culturile celulare pot fi contaminate cu mycoplasma, principalii contaminanți fiind speciile *M. orale*, *A. laidlawii*, *M. arginini* și *M. hyorhinis*. Cu toate că aceste mycoplasma nu ucid de obicei celulele contaminate, sunt dificil de detectat și pot determina o varietate de efecte în celulele cultivate, incluzând modificări ale creșterii metabolice, viabilitate și morfologie, astfel alterând proprietățile fenotipice ale celulelor gazda. Sunt disponibile multe metode de detecție a mycoplasma, incluzând izolarea din cultura în bulion/agar, colorația fluorescentă directă sau indirectă, ELISA, imunocolorația, PCR directă sau indirectă. Între aceste metode, PCR directă este o metodă foarte sensibilă, specifică și convenabilă atunci când design-ul primerilor este optim.

Trusa e-Myco™ VALiD-Q Mycoplasma qPCR Detection Kit se compune dintr-un set de primeri și sonde ce sunt specifice pentru regiunea codantă înalt conservată 16S-rRNA a mycoplasma, ce include *M. pneumoniae*, *M. arginini*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *M. orale* și *A. laidlawii*. Trusa este destinată detecției prezentei mycoplasma ca poate contamina materiale biologice cum sunt celulele cultivate. De asemenea, trusa poate detecta mycoplasma în decurs de 90 minute cu sensibilitate de până la 10 UFC/ml și include un control intern pentru verificarea runde de qPCR, pe lângă un DNA de control pozitiv.

PRINCIPII

- Tehnologia de amplificare a DNA în timp real (qPCR – reacție de polimerizare cantitativă a catenelor) demonstrează o mare sensibilitate și specificitate la detecția directă a patogenului (antigen). iNtRON a dezvoltat o platformă tehnică nouă pentru design de primeri, denumită tehnologia CLP™ (complementary locking primer) ce asigură flexibilitatea Tm (melting temperature) a design-ului primerilor, în vederea optimizării condițiilor de reacție, totodată crescând specificitatea și sensibilitatea PCR prin controlul amorsării (priming) nespecifice.
- Determinarea este de tip PCR în timp real, ce discriminează mycoplasma într-o singură reacție. Determinarea are 2 etape principale: (1) extracția DNA din probe, și (2) amplificarea DNA extras folosind o sondă fluorescentă 5' nucleazică (marcată la capatul 5') și o pereche de primeri specifici. Testul amplifică 2 regiuni specifice: Mycoplasma (FAM) și IPC (HEX). Un control intern folosește de monitorizarea procesului de extracție și la depistarea inhibiției PCR.
- Controlul pozitiv intern (IPC) a fost introdus în trusa spre a verifica succesul reacției PCR în timp real. IPC este coamplificat cu secvența țintă din probele de testat.

CONTINUTUL TRUSEI

Nr.	Continut	Compoziție
1	2X qPCR Master Mix Solution	Soluție pentru reacția Real-time PCR < 0.01% dATP, dTTP, dGTP, dCTP < 0.01% Enzima PCR Hot start < 0.01% Materiale additive specifice PCR
2	Mycoplasma Detection Solution	Soluție de detecție a Mycoplasma < 0.001% Primeri/sonda pentru Mycoplasma < 0.001% Set primeri/sonda pentru control intern < 0.001% DNA de Control Intern
3	Positive Control (External PC)	Control pozitiv de Mycoplasma < 0.001% DNA Recombinant ce conține secvența 16S de <i>M. hyorhinis</i>
4	DNase/RNase Free Water	Apa distilată ultrapură sterilizată

APPLICATION

Trusa se folosește la detecția speciilor de mycoplasma cel mai adesea întâlnite în culturi celulare, incluzând *M. pneumoniae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, și *A. laidlawii*. În plus, acest kit poate detecta și alte specii de mycoplasma.

REQUIREMENTS INSTRUMENT

- Instrument Real-time PCR
- Pipete & Varfuri sterile pentru pipete (cu filtru)
- Manusi de unică utilizare
- Centrifuga pentru tuburi de micro-centrifuga
- G-spin™ Total Extraction Kit (Cod 17046)
- Centrifuga de masă
- Vortex mixer
- Colorant de fluorescență pasiv (Optional) pentru instrumentele ce folosesc referința pasivă

NOTICE

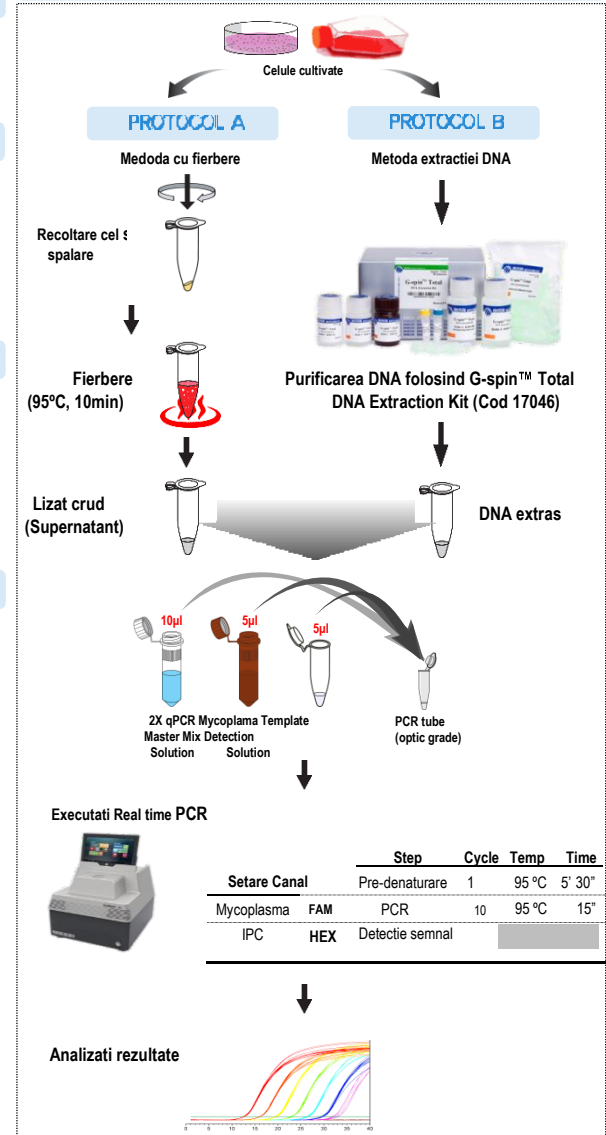
- Pentru a preveni contaminarea DNA de mycoplasma în timpul testării, purtați întotdeauna măști la pregătirea probelor și a reacției PCR.
- Pentru a evita fals pozitivitate, apa folosită în reacțiile PCR poate fi iradiată UV.
- Dacă nu se obține niciun semnal la controlul intern pozitiv, înseamnă că e o problemă cu procesul de amplificare PCR. Va rugăm repetați testarea.
- Dacă se obține un semnal nespecific în controlul negativ, poate fi o contaminare ori o țintă depășită cantitativ (prea concentrată). Va rugăm retestați cu o cantitate adecvată de țintă.

PACKAGING / STORAGE INFORMATIONS

Continut	Depozitare	Cantitate
2X qPCR Master Mix Solution	sub -20°C	280 µl x 2 tuburi (10 µl / test x 50 teste)
Mycoplasma Detection Solution	sub -20°C	140 µl x 2 tuburi
Positive Control (External PC)	sub -20°C	50 µl x 3 tuburi
DNase/RNase Free Water	-	1 ml x 1 tub
Manual de utilizare	-	1

- 12 luni de la data fabricației.
- În decurs de 6 luni după deschidere, în limita datei de expirare a kitului.

OVERVIEW OF MYCOPLASMA DETECTION



SAMPLE PREPARATION

※ PROTOCOL

Puteți folosi acest protocol doar pentru detectia contaminarii cu mycoplasma. Insa, daca doriti sa efectuati si genotiparea pentru determinarea precisa a speciilor, va rugam sa purificati DNA genomic din celulele suspectate de infectie cu Mycoplasma, folosind trusa noastra G-spin™ Total DNA Extraction Kit (Cod17045). Puteți utiliza acest protocol de la noi sau alte metode generale cu fierbere pe care le aplicati.

[SFAT TEHNIC]

1. Folositi manusi curate de unica utilizare atunci cand efectuati testarea si asigurati-va ca aria de lucru este curata inainte de a trece la organizarea lucrului.
2. Pastrati tuburile cu reactivii si amestecul PCR pe bloc rece pe durata pregatirii reactiei.
3. Utilizati pipete cu positive displacement (care nu au aer intre piston si lichidul pipetat).
4. Aria de amplificarea si cea de preparare trebuie sa fie separate fizic.

※ Preparing samples for DNA extraction

1. Preparati suspensiile celulare din cultura intr-un tub curat de 1,5 ml. Apoi numarati celulele cu metodele cunoscute de numarare. Aveti nevoie de minim 5x10⁴ celule per test.



Recoltati celulele aderente cu tampon tripsina-EDTA aplicand tehnica standard. Pipetati 1 ml de celule aderente tripsinizate. In general, celulele in suspensie nu necesita tripsinizare. Va recomandam sa numarati celulele. Trebuie sa pregatiti cel putin 5x10⁴ celule per test.



Infectiile masive cu mycoplasma pot fi detectate in 10~100 celule, pe cand infectiile usoare necesita peste 5000~50000 de celule. Puteți dilua probele in conformitate cu rata infectiei pe care o suspectati

2. Transferati celulele numarate (peste 5x10⁴ celule) intr-un tub curat de 1,5 ml. Centrifugati tubul in microcentrifuga timp de 10~15 secunde. Aruncati cu grija supernatantul.

※ PROTOCOL A : Using genomic DNA extraction method

Va recomandam sa folositi trusa G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON, cod 17045), ce poate extrage DNA genomic din celule peletate. Daca folositi acest produs, extrageti DNA genomic din celule peletate aplicand protocol C (iNtRON, Cod 17045) sau puteti folosi kitul de extractie pe care il aveti in laborator.



Mycoplasma este un gen de bacterii ce creste ca parazit intr-o celula gazda si care supravietuieste independent numai in conditii de crestere specifice. Prin urmare, pentru testarea mycoplasma in mediul de cultura celulara, puteti extrage DNA genomic din celule peletate (consultati paragrafele 1 si 2 "Preparing samples for DNA extraction").

※ PROTOCOL B : Using the Boiling method

1. Pentru extragerea DNA genomic din probe, urmariti paragrafele 1 si 2 "Preparing samples for DNA extraction".
2. Resuspendati celulele in 1 ml de TFS steril sau in tampon DPBS pentru a le spala.
3. Centrifugati tubul in microcentrifuga timp de 10~15 secunde. Eliminati cu grija supernatantul.



[Optional] Repetati aceasta etapa de spalare inca o data pentru a reduce inhibitia PCR

4. Resuspendati peletul in 100 µl de TFS steril sau tampon DPBS steril.



Pentru controlul negativ, folositi 5 µl de apa libera de DNaze in locul DNA genomic si pentru controlul pozitiv folositi 5 µl de proba Positive Control DNA pe care o gasiti inclusa in kit



Daca doriti cele mai bune rezultate, folosirea tamponului TFS este preferabila tamponului Tris (10 mM, pH 8.5), sau tamponului TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA), sau apei distilate autoclavata.

5. Incubati proba la 95 °C timp de 10 min, apoi vortexati usor 5-10 sec. Apoi, centrifugati proba 2 min la 13000 rpm intr-o centrifuga de masa (la temperatura camerei, RT).
6. Transferati o portiune din supernatantul fier intr-o eprubeta noua. Acest supernatant va fi folosit ca matrita in reactia PCR. (Pastrati probele pana la 7 zile la 2+~8°C sau la -18~20°C pentru perioade mai lungi)

PCR TEST PROTOCOLS

※ Precautions before Testing

- Inaintea testarii, lasati kitul la 4°C sau in camera sa se dezghete. Nu depasiti 1 ora daca dezghetati la temperatura camerei.
- Folositi manusi curate de unica folosinta cand efectuati testarea si asigurati-va inainte de pregatirea testarii ca aria de lucru este curata.
- Toate procedurile trebuie executate pe o masa de lucru curata ce trebuie curatata dupa utilizare cu etanol 70% ori clor menajer 10% (hipoclorit de sodiu). Probele folosite trebuie pastrate separat. Daca le eliminati, considerati-le deseuri biologice periculoase. Sterilizati-le prin autoclavare inainte de a le elimina.

※ Test Procedure

1. Preparati Detection Mix (Master) prin pipetarea componentelor in fiecare tub de PCR in maniera urmatoare.

Un numar adecvat de tuburi inseamna a combina doua tuburi pentru fiecare proba, incluzand un control pozitiv si unul negativ.

Componente	Solutie Master (per test)
2X qPCR Master Mix Solution	10 µl
Mycoplasma Detection Solution	5 µl
Volum total	15 µl

2. Pipetati supernatant 5µl si Solutie Master 15µl in tubul PCR.



Pentru Control Negativ: 5µl de apa libera de DNaze/RNaze



Pentru Control Pozitiv: 5µl Positive Control

3. Dupa centrifugare, introduceti-le in instrumentul de PCR in timp real si porniti reactia.

Step	Cycle	Temp	Time	Stabilirea canalului	
Pre-denaturare	1	95 °C	5' 30"	Mycoplasma	FAM
PCR si Detectie Semnal	40	95 °C	15"	IPC	HEX
		58 °C	1'		

☞ Aria colorata cu gri semnifica detectia semnalului

DATA VALIDATION

1. Dupa terminarea reactiei, stability valoarea prag cut-off in acord cu tabelul de mai jos

Setati Manual baseline	Threshold	Valoare Ct Cut-off
3 ~15	Auto	Dupa ciclul 36

❖ Stabilirea Manuala a Threshold : Trageti de linia threshold in grafic. Adaptati-o la saturatie de 5~10% din nivelul de fluorescenta a reactiei controlului pozitiv.

2. Validarea rezultatelor: Valorile Ct pentru controale trebuie sa fie ca in tabel.

Sample	FAM	HEX	Sample	FAM	HEX
Control Pozitiv	18 ~ 22	22 ~ 25	Control Negativ	N/A ori > 36	22 ~ 25

DATA INTERPRETATION

Datele preconizate dupa reactia Real-time PCR

Nr.	Probe	Mycoplasma (FAM)	IPC (HEX)	Interpretare
1	Control Pozitiv	+	+	Valid
2	Control Pozitiv	+	-	Valid
3	Control Pozitiv	-	+	Invalid (degradare control pozitiv)
4	Control Pozitiv	-	-	Retest (Reaction failure)
5	Test 1	+	+	Pozitiv
6	Test 2	+	-	Pozitiv (conc. inalta de DNA Mycoplasma)
7	Test 3	-	+	Negativ (liber de Mycoplasma)
8	Control Negativ	-	+	Valid
9	Control Negativ	+	+	Contaminare
10	Control Negativ	-	-	Retestare (Reactie esuata)

- ❖ Valoarea Ct pentru IPC (canal HEX) sau proba clinica este de obicei intre 15 si 35.
- ❖ Valoarea Ct pentru IPC de peste 25 poate rezulta din reactia de competitie cu o cantitate foarte mare de DNA tinta. Acest rezultat este normal.

TROUBLESHOOTING GUIDE

Observatie	Cauza posibila	Recomandare
ΔRn ≤ No Template Control ΔRn, si lipsa curba amplificare	Alegere incorecta a fluoroforilor	Verificati atribuirea fluoroforilor inainte de analiza datelor
	Ati omis o componenta de reactie	Verificati ca ati pipetat reactivii corecti
	Tinta degradata sau neadugata (lipsa proba)	Repetati cu tinta noua
	Inhibitor de reactie prezent	Repetati cu tinta purificata
ΔRn ≤ No Template Control ΔRn, si ambele reactii arata amplificare	Reactivi contaminati cu tinta	Verificati tehnica si echipamentul pentru a limita contaminarea. Utilizati reactivi proaspeti Repetati cu varfuri cu bariera dupa ce ati curatat aria
	Curba de amplificare este inversata Curbe de amplificare in afara fazei logaritmice	Resetati valoarea superioara/inferioara a baseline (2 cicluri sub valoarea Ct) ori repetati cu proba diluata Reoptimizati conditiile de reactie
Valoarea Ct mai mare decat preconizat	Ati adaugat mai putina tinta decat necesar	Cresteti cantitatea de proba
	Proba este degradata	Evaluati integritatea probei
	More template added than expected	Reduceti cantitatea de proba
Valoarea Ct mai mica decat preconizat	Contaminarea reactivilor cu tinta	Verificati tehnica si echipamentul pentru a limita contaminarea. Utilizati reactivi proaspeti. Repetati cu varfuri cu bariera dupa ce ati curatat aria

EXPLANATION OF SYMBOLS

문서번호: INT-IFU-25245-R08

작성일자: 2024. 4. 18

Manufactured by
Africana
Consult Instructions For Use



Manufacturing date
Expire date
Keep away from sunlight



Sufficient for tests
Do not reuse
Storage temperature limitation



Batch number
In vitro diagnostic
Product number

