

**vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit  
 (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*)  
 -5'Nuclease- real-time PCR kit**

**Order No. V 740 01**

**Instruction For Use  
 Version 2, July 2017 - EN  
 For Research Use Only (RUO)**

The **vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*)** can be used for the qualitative detection of *Mycoplasma gallisepticum* (FAM-channel) and *Mycoplasma synoviae* (VIC/HEX-channel).

**A. Real-time PCR Time-Temperature Protocol**

The following procedure is optimized for a real-time PCR instrument with FAM (for *M. gallisepticum*), VIC/HEX (for *M. synoviae*) and Cy5 (for Internal Control) detection channel. Program the PCR instrument before preparing the reaction mixes. Use the following real-time PCR-protocol for the **vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit** (for details on how to program the experimental protocol, see the Instrument Operator's Manual of your real-time PCR-cycler):

Temperature	Time	Cycle
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C *	60 sec	

\* Fluorescence detection in this step

**Notes:** For users of the LightCycler® 480 Systems I and II: A Color Compensation is necessary and will be supplied by BIOTECON Diagnostics for users of the LightCycler® 480 Systems I and II. Please contact BIOTECON Diagnostics for further information.

**Store at -15°C to -25°C. Expiry Date: see kit label.**

**B. Preparation of the PCR Mix**

To prevent the risk of contamination with foreign DNA, we recommend that all experiment steps be performed in a PCR clean room or separated area. Filter tips are recommended for each step. Always wear gloves when handling the PCR-vessels.

1. Thaw the kit components. Using ice or lab top cooler is recommended during experiment for maintaining the enzyme activity. Briefly centrifuge the tubes to remove air bubble and drops from the inside of the cap.
2. Total reaction volume is 20 µl, the volume of DNA sample is 6 µl. Prepare a reaction mixture according to the table below. Mix the reagents in the PCR reaction tubes by pipetting up and down.



The volumes indicated below are based on a single 20 µl standard reaction. Prepare the PCR mixture by multiplying the volume by the number of reactions required plus one or two additional reactions to cover pipetting losses.

Component	Volume
Primer / Probe Mixture	4 µl
2x Real-time PCR Master Mix	10 µl
Total	14 µl





- Pipet 14 µl PCR mix into each PCR vessel.
  - For the **samples of interest**, add 6 µl sample DNA.
  - For the **negative control**, add 6 µl H<sub>2</sub>O PCR-grade instead of sample DNA.
  - For the **positive control**, add 6 µl of Control DNA instead of sample DNA.
- Seal the PCR vessels accurately with optical caps or sealing foil.
- Briefly spin the PCR vessels in a suitable centrifuge.
- Cycle the samples as described above.

### C. Data Interpretation

The amplification of *Mycoplasma gallisepticum* DNA is analyzed in the FAM detection channel. The amplification of *Mycoplasma synoviae* DNA is analyzed in the VIC/HEX, and the Internal Control in the Cy5 detection channel.

Channel FAM	Channel VIC/HEX	Channel Cy5	Result Interpretation
Positive	Negative	Positive or Negative	Positive for <i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Negative	Positive	Positive or Negative	Positive for <i>Mycoplasma synoviae</i>
Negative	Negative	Positive	Negative for <i>Mycoplasma gallisepticum</i> and for <i>Mycoplasma synoviae</i>
Negative	Negative	Negative	Invalid

### D. Explanation of Symbols

- REF** Product number
-  Contains sufficient for "n" tests/reactions (rxns)
-  Storage Temperature
-  Batch code
-  Expiry Date

BIOTECON Diagnostics GmbH  
 Hermannswerder 17  
 14473 Potsdam – Germany  
 Phone +49 (0) 331 2300-200  
 Fax +49 (0) 331 2300-299  
 bcd@bc-diagnostics.com  
 www.bc-diagnostics.com

vetproof® is a registered trademark of BIOTECON Diagnostics. LightCycler® is a trademark of Roche Diagnostics.



# vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*)

-5'Nuclease- real-time PCR kit

Artikel-Nr. V 740 01

## Gebrauchsinformation (GI)

Version 2, Juli 2017 - DE  
 (Nur für Forschungszwecke)

Das vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*) dient der qualitativen Detektion von *Mycoplasma gallisepticum* (FAM-Kanal) und *Mycoplasma synoviae* (VIC/HEX-Kanal).

### A. Real-time PCR Zeit-Temperatur-Protokoll

Das folgende Protokoll ist optimiert für Real-Time PCR Instrumente mit einem FAM (*M. gallisepticum*), VIC/HEX (*M. synoviae*), und Cy5 (Interne Kontrolle) Detektionskanal.

Das Real-Time PCR-Instrument sollte vor der Probenvorbereitung programmiert werden. Folgendes Real-Time PCR-Protokoll muss für das vetproof® SL *Mycoplasma* Multiplex Detection Kit eingesetzt werden (wie Sie Ihr jeweiliges Real-Time PCR Instrument programmieren, entnehmen Sie bitte der entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes).

Temperatur	Zeit	Zyklus
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C *	60 sec	

\* Fluoreszenzmessung in diesem Schritt

**Notes:** Für Nutzer des LightCycler® 480 Systems I und II ist eine Color Compensation notwendig und wird von BIOTECON Diagnostics vertrieben. Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte BIOTECON Diagnostics.

Lagerung des Kits bei -15°C bis -25°C. Haltbarkeit: siehe Etikettenaufdruck.

### B. PCR Setup

Um das Risiko an Kontaminationen mit Fremd-DNA zu minimieren empfehlen wir, dass alle experimentellen Schritte in einem Reinraum oder einem gesonderten PCR Bereich durchgeführt werden. Nutzen sie Filter-Spitzen für Ihre Pipetten. Tragen Sie beim Umgang mit den PCR-Reaktionsgefäßen immer Handschuhe!

1. Lassen Sie die Kit-Komponenten auftauen. Um hohe Enzym Aktivität zu gewährleisten wird der Einsatz eines Kühl-Racks empfohlen. Zentrifugieren Sie die Reagenzien kurz, um Luftblasen und Tropfen im Deckel zu entfernen.
2. Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl. Das Probenvolumen beträgt 6 µl. Setzen Sie den Reaktionsmix laut folgender Tabelle an und mischen Sie den PCR-Ansatz durch kurzes Hoch- und Runter- Pipettieren.

Die Volumina sind für eine Standard Reaktion mit 20 µl dargestellt. Um einen Mix für mehrere Reaktionen herzustellen, müssen die Volumina multipliziert werden mit der Anzahl der Reaktionen und 1-2 weiteren Reaktionen um Pipettierverluste auszugleichen.

Komponente	Volumen
Primer / Probe Mix	4 µl
2x Real-time PCR Master Mix	10 µl
Summe	14 µl





- Füllen Sie jeweils 14 µl des PCR-Mix in ein Reaktionsgefäß.
  - Von jeder Probe werden 6 µl zugegeben.
  - Für die Negativkontrolle werden 6 µl PCR-grade H<sub>2</sub>O (statt Proben-DNA) zugegeben
  - Für die Positivkontrolle werden 6 µl der Control-DNA (statt Proben-DNA) zugegeben
- Schließen Sie die Gefäße mit Deckelstreifen oder 96-PCR-Platten Klebefolie
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz in einer entsprechenden Zentrifuge.
- Stellen Sie die Proben in den PCR-Cycler und starten Sie das Programm wie oben beschrieben.

### C. Interpretation der Daten

Die Amplifizierung der *Mycoplasma gallisepticum* DNA wird im FAM Detektionskanal analysiert; die der *Mycoplasma synoviae* DNA im VIC/HEX Detektionskanal und die interne Amplifikationskontrolle im Cy5 Detektionskanal.

Kanal FAM	Kanal VIC/HEX	Kanal Cy5	Ergebnis Interpretation
Positiv	Negativ	Positiv oder Negativ	Positiv für <i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Negativ	Positiv	Positiv oder Negativ	Positiv für <i>Mycoplasma synoviae</i>
Negativ	Negativ	Positiv	Negativ für <i>Mycoplasma gallisepticum</i> und für <i>Mycoplasma synoviae</i>
Negativ	Negativ	Negativ	Ungültig

### D. Erläuterung der Symbole

- REF Artikelnummer
-  Ausreichend für "n" Tests/Reaktionen (rxns)
-  Lagertemperatur
-  Chargennummer
-  Haltbarkeit

BIOTECON Diagnostics GmbH  
 Hermannswerder 17  
 14473 Potsdam – Germany  
 Phone +49 (0) 331 2300-200  
 Fax +49 (0) 331 2300-299  
 bcd@bc-diagnostics.com  
 www.bc-diagnostics.com