



PCR detection of mycoplasma contamination of tissue cultures.

Created: Oct 16, 2008; Last modified: Mar 23, 2021, Version: 2.0

Este protocolo describe los componentes y las condiciones de amplificación por PCR empleados para detectar la presencia de bacterias del género *Mycoplasma* como contaminante de cultivos primarios y de líneas celulares humanas. Los oligonucleótidos se basan en aquellos descritos por Hopert A, 1993 en un acercamiento no-anidado según lo describe Uphoff CC, 2002. Los oligonucleótidos reconocen secuencias del gen codificante para rRNA 16S que se encuentran conservadas en al menos 25 especies diferentes de mollicutes, incluyendo a aquellas comúnmente implicadas en la contaminación de cultivos celulares. La especificidad de los oligonucleótidos ha sido corroborada para *M. arginini*, *M. Fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. laidlawii*, *M. orale*, *M. hominis* y *M. bovis* (Hopert A, 1993). Dependiendo de la especie de mycoplasma presente el tamaño del amplicón oscila entre los 510–520 bp.

Extracción de DNA de líneas celulares en cultivo

1. Dentro de un gabinete de seguridad biológica clase II y en apego a las normas de bioseguridad correspondientes para la línea celular, obtenga una alícuota de 1 mL de sobrenadante de medio de cultivo.
2. Centrifuge a 13,000 G en una microcentrífuga y descarte el sobrenadante.
3. Lave en dos ocasiones el pellet celular con PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos) a pH de 7.4.
4. Después del segundo lavado resuspenda el pellet celular en 100 µL de PBS e incube a 95°C durante 15 minutos.
5. Proceda a la extracción de DNA empleando el kit de extracción de su preferencia.

Características de los oligonucleótidos cebadores empleados

Oligo	Secuencia	bp	%GC	Tm (°C)	Ta (°C)
FMYC1	5'-CGC-CTG-AGT-AGT-ACG-TTC-GC-3'	20	60	57.8	60
FMYC2	5'-CGC-CTG-AGT-AGT-ACG-TAC-GC-3'	20	60	57.3	60
FMYC3	5'-TGC-CTG-AGT-AGT-ACA-TTC-GC-3'	20	50	54.4	60
FMYC4	5'-TGC-CTG-GGT-AGT-ACA-TTC-GC-3'	20	55	57.1	60
FMYC5	5'-CGC-CTG-GGT-AGT-ACA-TTC-GC-3'	20	60	58.1	60
FMYC6	5'-CGC-CTG-AGT-AGT-ATG-CTC-GC-3'	20	60	57.8	60
RMYC1	5'-GCG-GTG-TGT-ACA-AGA-CCC-GA-3'	20	60	59.7	60
RMYC2	5'-GCG-GTG-TGT-ACA-AAA-CCC-GA-3'	20	55	58.1	60





Componentes de PCR

		1
dH ₂ O	<i>C_f</i>	2.375
10x Buffer	1X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	2.5 mM	0.62
dNTPs 10 mM	200 μM	0.125
Oligos 0.5 μM	0.2 μM	5
Taq 5 UI/μL	0.02 UI/μL	0.125

Volumen de master mix	9.5
-----------------------	-----

Volumen por dispensar a tira de 8	-
Volumen por dispensar a c/tubo	9.5

DNA	ca 500 ng	3
-----	-----------	---

V _f (μL)	12.5
---------------------	------

Condiciones de PCR

Temperatura	95°C	58°C	72°C	95°C	60°C	72°C	72°C	25°C
Tiempo	30''	2'	10'	10''	10''	30''	10'	∞
Ciclos	1x			30x				

Notas

1. Limpiar area de trabajo con NaOCl 0.1% y Etanol al 70% antes y después de preparar la PCR.
2. Preparar la PCR en hielo y mezclar en vortex el master mix al terminar de agregar los componentes.
3. Emplear la micropipeta apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!
4. Una vez preparado el master mix distribúya 108 μL a cada tubo de una tira de 8 microtubos de PCR para permitir el uso de la micropipeta multicanal a la hora de dispensar el volumen final a cada microtubo.
5. Distribuya 12 μL de la mezcla madre a cada tubo de PCR empleando la micropipeta multicanal.
6. Agregue 0.5 μL de la dilución de trabajo de DNA a 100 ng/μL a cada tubo empleando la





micropipeta multicanal.

7. Coloque los microtubos en el termociclador y corrase el programa MYCOPLASMA.

Referencias

1. Hopert A, Uphoff CC, Wirth M, Hauser H, Drexler HG. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. *J Immunol Methods*. 1993 Aug 26;164(1):91-100.
2. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell*. 1999 Dec;12(4):229-36. Review.

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Changes to document format only.

