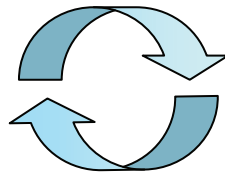


## PCR Mycoplasma Detection Set Manual

### Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 23](#)



### Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 11](#)

### Description

PCR Mycoplasma Detection Set is a primers set designed to detect the presence of mycoplasma which might contaminate biological materials such as cultured cells. Culture of mycoplasma on selective media has been the method for detection of the organism in samples and it takes one week to obtain results. With PCR detection and this primer set results are obtained in a few hours. As the presence of contaminant mycoplasma can be easily detected by only verifying the bands of amplified DNA fragments in electrophoresis, there is no need to prepare probes labelled with radioisotope, etc. This primers set allows detection of species of Mycoplasma, (*M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonalis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum*) and one species Ureaplasma (*U. urealyticum*) with high sensitivity. These species can be differentiated on the basis of size if necessary.

### Principle

rRNA gene sequences of procaryotes, including mycoplasma, are well conserved. Whereas, the length and sequences of the spacer region in the rRNA operon (for example, the region between 16S and 23S gene) differs from species to species. Some parts of this spacer region vary depending on species even among mycoplasmas and some parts are well conserved. The detection procedure utilizing the PCR process with the primers set is

- 1) amplify this spacer region using two primers (F1 and R1) on the DNA encoding rRNA of 16S and 23S)
- 2) perform Nested PCR using two primers F2, which is designed on the basis of this conserved region, and R2 on the 23S gene

This system does not allow the amplification of DNA originated from other sources, such as cultured cells, which affect the detection result. Amplification of gene sequence with PCR using this primer set enhances not only the sensitivity but also the specificity of detection.

Amplified products are then detected by agarose gel electrophoresis.

### Procedures:

When the sample to be tested is a supernatant or a cell suspension of cultured cells grown in a medium such as Eagle's Medium, samples can be directly applied to the PCR process to amplify mycoplasma DNA. However, in case that materials which inhibit reaction might be present in the sample, extracted DNA should be used.

#### A. 1<sup>st</sup> PCR

- (1) Prepare the reaction mixture in a tube by combining the reagents shown below.

Reagents	Volume
Millipore water	59,5 – 69 $\mu$ L
10 x PCR Buffer	10 $\mu$ L
dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	8 $\mu$ L (2 $\mu$ L of each dNTP)
MCGp F1 Primer	1 $\mu$ L
MCGp R1 Primer	1 $\mu$ L
Ampli Taq Polymerase	0,5 $\mu$ L

- (2) Add 10  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> solution (25 mmol/L) to the above reaction mixture
- (3) Add sample (0,5 – 10  $\mu$ L) to the above reaction mixture to the total volume of 100  $\mu$ L.  
Note: Care should be taken to prevent cross contamination when adding sample.
- (4) Place all tubes in DNA Thermal Cycler. Set the parameters for the following conditions and perform PCR.

Hold:	94°C	30 sec.
Cycl (30 cycles):	94°C	30 sec.
	55°C	2 min.
	72°C	1 min.
Hold:	4°C	$\infty$

**B. 2<sup>nd</sup> PCR**

- (1) Prepare the reaction mixture in a tube by combining the reagents shown below.

Reagents	Volume
Millipore water	68,5 µL
10 x PCR Buffer	10 µL
dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	8 µL (2 µL of each dNTP)
MCGp F2 Primer	1 µL
MCGp R2 Primer	1 µL
Ampli Taq Polymerase	0,5 µL

- (2) Add 10 µL MgCl<sub>2</sub> solution (25mmol/L) to the above reaction mixture
- (3) Carefully add 1 µL of 1<sup>st</sup> PCR product to the above reaction mixture.  
Note: Care should be taken to prevent cross contamination when adding 1<sup>st</sup> PCR products.
- (4) Place all tubes in DNA Thermal Cycler. Set the parameters for the following conditions and perform PCR.

Hold: 94°C 30 sec.  
 Cycl (30 cycles): 94°C 30 sec.  
 55°C 2 min.  
 72°C 1 min.  
 Hold: 4°C ∞

**C. Analysis of amplified products by gel electrophoresis**

- (1) Apply 10 µL each of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> PCR products to the gel electrophoresis
- (2) Perform agarose gel electrophoresis with the PCR amplified samples to verify the amplified product and its size. For 1<sup>st</sup> PCR products agarose (w=1,0%) gel is used, for 2<sup>nd</sup> PCR products agarose (w=2,0%) gel is used.

Species	Pairs of Primer	
	F1 and R1 (bp)	F2 and R2 (bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. pulmonis</i>	477	189
<i>M. hyorhinis</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. capricolum</i>	415	179
<i>M. arthritis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370, 369	147, 148
<i>M. arginini</i>	369	145
<i>U. urealyticum</i>	485, 481	154

This table shows the sizes of DNA fragments of 12 species of mycoplasma

#### D. Control Template

By the addition of 1  $\mu$ L of Control Template to the sample, PCR efficiency can be checked. The sizes of the PCR products obtained using the control template with primer pairs of F1 and R1, and F2 and R2 are 810 bp and 590 bp, respectively.

**Vocabulary**

<b>affect</b>	<b>sich auswirken auf</b>
<b>amplify</b>	<b>hier: exponentielle (verstärkte) Vermehrung von Nucleinsäure-Fragmenten</b>
<b>apply</b>	<b>auftragen, applizieren</b>
<b>avoid</b>	<b>vermeiden</b>
<b>conserved</b>	<b>erhalten, konserviert</b>
<b>depending on</b>	<b>abhängig von</b>
<b>detection, to detect</b>	<b>entdecken, aufspüren</b>
<b>differ</b>	<b>sich unterscheiden</b>
<b>differentiate</b>	<b>unterscheiden</b>
<b>efficiency</b>	<b>Effizienz, Leistungsfähigkeit</b>
<b>enhance</b>	<b>verbessern, erhöhen</b>
<b>evaporation</b>	<b>Verdampfung</b>
<b>including</b>	<b>einschließlich</b>
<b>inhibit</b>	<b>hemmen</b>
<b>label</b>	<b>markieren</b>
<b>manual</b>	<b>Handbuch</b>
<b>necessary</b>	<b>nötig, notwendig</b>
<b>obtain</b>	<b>erhalten</b>
<b>overlay</b>	<b>überschichten</b>
<b>PCR (Polymerase Chain Reaction)</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>
<b>perform</b>	<b>durchführen</b>
<b>presence</b>	<b>Anwesenheit</b>
<b>prevent</b>	<b>vorbeugen</b>
<b>primer</b>	<b>Kurzes Oligonukleotid, das sich an ein einzelsträngiges DNA-Molekül anheftet und so einen Startpunkt für die DNA-Replikation bildet</b>
<b>respectively</b>	<b>beziehungsweise</b>
<b>sensitivity</b>	<b>Empfindlichkeit</b>
<b>source</b>	<b>Quelle</b>
<b>specificity</b>	<b>Genauigkeit</b>
<b>supernatant</b>	<b>Überstand</b>
<b>template</b>	<b>Schablone; hier: DNA-Molekül, das vermehrt werden soll</b>
<b>utilize</b>	<b>verwenden</b>
<b>vary</b>	<b>sich unterscheiden, abweichen</b>
<b>verify</b>	<b>bestätigen</b>
<b>whereas</b>	<b>wohingegen</b>

**Hinweis: Beim Pipettieren der Reaktionsansätze zu beachten:**

- Sollen mehrere Reaktionen angesetzt werden, so pipettiert man einen "Mastermix", aus dem dann die Reaktionsgefäße bestückt werden.  
Ein Mastermix besteht aus Wasser, 10 x PCR-Puffer, dNTPs, Primern und Polymerase.
- Die dNTPs werden unverdünnt eingesetzt (eine Verdünnung findet dann natürlich durch die anderen Komponenten des Mastermix statt). Werden also wie hier 8 µL dNTPs pro Reaktionsansatz benötigt, so setzt man 2 µL von jedem der vier dNTPs ein.
- Der PCR-Puffer enthält kein Magnesiumchlorid, es muss also als wichtiger Cofaktor der Polymerase separat zugesetzt werden. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 25 mmol/L. Als Endkonzentration wird ein Bereich zwischen 1,0 und 4,0 mmol/L empfohlen. Da hier auf 100 µL Reaktionsansatz 10 µL Magnesiumchlorid in der angegebenen Konzentration gegeben werden, kommt man auf eine Endkonzentration von 2,5 mmol/L.
- Nach der Herstellung des Mastermix wird dieses auf die entsprechende Anzahl Reaktionsgefäße verteilt. Zu 80 µL Mastermix werden nun noch 10 µL Magnesiumchloridlösung und 10 µL Template (kann unverdünnte DNA-Lösung sein, kann aber z.B. auch 1 µL DNA-Lösung + 9 µL Wasser sein) pipettiert.
- Die Methodennummer für den Mykoplasmenachweis am Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 ist die 9.

**Wichtiger Hinweis:**

Diese Arbeitsanweisung muss bei Materialänderungen im Testkit dem aktuellen Beipackzettel angepasst werden!!