GARANTÍA

BIOTOOLS garantiza la conformidad de los productos con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados) o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición. Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados y para uso exclusivo en investigación. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:
BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto a cumplimiento de los requisitos de la ISO 9001 para las siguientes actividades: Fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – Spain

© 2009 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.
BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
E-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

MYCOPLASMA *GEL DETECTION* KIT

Kit pre-alicuoteado para la detección de mycoplasmas en muestras de cultivos celulares por PCR a tiempo final

REF.	FORMATO	CONTENIDO
90.021	48 rxns	Mycoplasma *Gel Detection Kit*
90.022	192 rxns	Mycoplasma *Gel Detection Kit*
90.044	1 vial	Gelified Positive Control
90.045	1 vial	Gelified Internal Amplification Control

Almacenar a -20ºC

Aviso a usuarios: Algunas de las aplicaciones que pueden llevarse a cabo con este producto están cubiertas por patentes aplicables en ciertos países. La adquisición de este producto no incluye o provee de una licencia para realizar aplicaciones patentadas. En algunos casos, los usuarios tienen la obligación de adquirir una licencia, dependiendo del país y/o la aplicación.

Ed .07 – Febrero 2025

1. DESCRIPCIÓN

Los Mycoplasmas, bacterias extremadamente simples y pequeñas del grupo de los *Mollicutes* constituyen los contaminantes principales de los cultivos celulares. Aunque aparentemente imperceptibles, los *Mycoplasmas* pueden causar efectos severos sobre las células eucariotas alterando la expresión normal de genes, la inmunidad y el crecimiento celular. La contaminación de cultivos celulares por *Mycoplasmas* representa un serio problema en la investigación básica y en la producción biofarmacéutica.

El **Mycoplasma *Gel Detection* kit** de Biotools permite detectar contaminación por *Mycoplasmas* en sobrenadante de cultivo celular por PCR a tiempo final mediante la amplificación de una región conservada del ARNr 16S. El kit de Biotools detecta simultáneamente un control interno de amplificación que permite descartar la presencia de inhibidores de PCR en la muestra.

El Mycoplasma *Gel Detection* kit es un método rápido, simple y sensible en el que la reacción de amplificación se proporciona en formato gelificado “ready to use”. El formato gel pre-alicuoteado reduce el tiempo de manipulación, los riesgos de contaminación, permite la manipulación a temperatura ambiente sin comprometer la eficiencia o la sensibilidad del ensayo.

El Mycoplasma Gel Detection kit identifica más de 20 de las especies que más frecuentemente infectan los cultivos celulares; entre ellas *M. arginini, M. fermentans, M. hyorhinis, M orale, A. laidlawi* (ver detalle en Apéndice). El kit no detecta otros moldes de ADN procariota ni moldes de ADN eucariota. La sensibilidad de la PCR utilizando el kit de Biotools es de 10 copias de ADN molde por reacción.

2. COMPONENTES DEL KIT

El **Mycoplasma *Gel Detection* kit** contiene reactivos suficientes para 48 ó 192 determinaciones. Contenido del kit:

- ***Gelified Mix:*** 6 tiras de 8 viales gelificadas (48 rxns) ó 24 tiras de 8 viales gelificadas (192 rxns)

  Mezcla de reacción gelificada y pre-alicuoteada, optimizada para un volumen final de 25 µl, incluye todos los componentes de reacción, incluso los cebadores. Además de los cebadores específicos para la detección de *Mycoplasma spp.,* la mix gelificada incorpora un par de cebadores para la amplificación del control interno, que permite descartar inhibidores de PCR en la mezcla de reacción.

- ***Gelified Positive Control (PC):*** 1 vial gelificado (*tapa roja*).(48 rxns), 2 viales gelificados (tapa roja) (192 rxns). Fragmento de ADN no infeccioso de *M. fermentans* preparado por PCR y gelificado.

- ***Gelified Internal Amplification Control (IAC):*** 1 vial gelificado (*tapa azul*). (48 rxns), 2 viales gelificados (tapa azul) (192 rxns). Fragmento de ADN no infeccioso no relacionado con secuencia específica preparado por PCR y gelificado.

La **Gelified Mix** incluye en su formulación DNA Polymerase, Buffer de Reacción, $MgCl_2$, dNTPs, cebadores y estabilizantes en formato gelificado. Para llevar a cabo las reacciones de amplificación sólo es necesario añadir el ADN molde (o el ADN del control positivo), el ADN del IAC y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de la reacción (25 µl).

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Al recepcionar, conservar todos los componentes del Mycoplasma *Gel Detection* Kit a **-20ºC**. El envío del kit puede realizarse a temperatura ambiente.

Los ***controles gelificados*** deberán ser reconstituidos antes de su manipulación. Una vez rehidratados, deberán almacenarse a **-20°C** en alícuotas a fin de evitar someterlos a ciclos de congelación/ descongelación que pueden degradarlos. Se recomienda alicuotar en viales de baja retención. Para su manipulación posterior, las alícuotas deberán descongelarse y mantenerse en hielo.

Si el kit se manipula y conserva siguiendo estas recomendaciones, su estabilidad será la indicada en la etiqueta correspondiente.

4. INSTRUCCIONES DE USO

A. Preparación y Manipulación de la Muestra

El **Mycoplasma Gel Detection kit** ha sido optimizado para muestras de sobrenadante de cultivos celulares. Para la recogida de la muestra las líneas celulares deberán ser cultivadas hasta 90-100% de confluencia y en ausencia de antibióticos específicos para *Mycoplasmas*. La muestra del medio deberá recogerse después de 48-72 h del último cambio de medio a fin de incrementar la sensibilidad del ensayo.

Una vez recogido el sobrenadante del cultivo celular (500-1000 µl) en un vial estéril, la muestra será manipulada siguiendo uno de los protocolos detallados a continuación:

I. Protocolo Estándar: *Inactivación de ADNasas por Calor*

Si la muestra no se procesa inmediatamente, inactivar las ADNasas mediante inactivación térmica. Estas enzimas pueden actuar incluso a bajas temperaturas degradando el ADN molde.

1- Incubar el sobrenadante a 95 °C durante 10 min (utilizar viales con tapa de rosca o reforzar el sellado de la tapa).

2- Centrifugar brevemente (10-30 seg) para eliminar el *debris* celular antes de pipetear la muestra.

3- Conservar las muestras a 4 °C durante 3 días. Para almacenamientos más prolongados conservar a -20 °C.

II. Protocolo Alternativo: *Enriquecimiento mediante Centrifugación*

Este protocolo permite el enriquecimiento de la muestra e incrementa la sensibilidad del ensayo. Además, elimina la posible de interferencia de componentes del medio de cultivo.

1- Centrifugar a 13,000 x g durante 10-15 min (precipitado no siempre visible).

2- Descartar el sobrenadante y adicionar al precipitado 50 µl de Tris-HCl 10mM (o agua libre de nucleasas), mezclar con vortex.

3- Inactivar las ADNasas por calor incubando a 95 °C durante 5 min (utilizar viales con tapa de rosca o reforzar el sellado de la tapa).

4- Conservar las muestras a 4 °C durante 3 días. Para almacenamientos más prolongados conservar a -20 °C.

5- Centrifugar 10-30 seg para eliminar el *debris* celular antes de pipetear la muestra.

B. Preparación de los Controles Gelificados

Trabajar siempre en un área específica para la manipulación de controles de ADN. Esta área deberá estar separada de otras zonas de trabajo como el área de preparación de reactivos y el área de PCR.

1- Diluir el vial de **IAC** y el vial de **PC** en 500 µl de Tris 10 mM pH 8.0 (o agua libre de nucleasas) por pipeteo y mezclar ligeramente con vortex. (Para evitar la contaminación de las pipetas se recomienda realizar la resuspensión por pipeteo utilizando pipetas de un solo uso, como puede ser una pipeta Pasteur)

2- Realizar alícuotas de cada uno de los controles resuspendidos y conservarlas a -20 °C hasta su utilización. Se recomienda utilizar viales de baja retención para realizar las alícuotas.

3- Una vez descongeladas no se recomienda volver a congelar las alícuotas. Estas alícuotas son de un único uso a fin de evitar la degradación del ADN.

C. Preparación de las Mezclas de Reacción

1- Calcular el número de reacciones necesarias, no olvidar incluir al menos un control negativo (sin ADN) y un control positivo. Apartar el número adecuado de viales de **Gelified Mix**.

2- Adicionar los diferentes componentes de reacción siguiendo las instrucciones de la Tabla 1.

Tabla 1. ***Preparación de Mezclas de Reacción***

COMPONENTE	Control (-)	Control (+)	Muestras
ADN **IAC** *(tapa azul)*			6ul
ADN **PC** *(tapa roja)*		5µl	
Muestra			2µl
Agua libre de nucleasas	25µl	20µl	17µl

Nota: *Centrifugar la muestra antes de tomar la alícuota. Al pipetear evitar tomar material del precipitado; el* ***debris celular presenta un alto contenido de inhibidores*** *de PCR.*

3- **No resuspender los geles**, los reactivos gelificados se resuspenderán durante la desnaturalización inicial del programa de amplificación. Mezclar suavemente con los dedos (no utilizar vortex) y centrifugar ligeramente.

4- Programar el termociclador conforme a las instrucciones de la Tabla 2, colocar los viales en el equipo e iniciar el programa de amplificación.

Tabla 2. ***Programa de Amplificación***

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95ºC	2 min
32	95ºC 58ºC 72ºC	15 seg 90 seg 30 seg
1	72ºC	5 min
	4-8ºC	∞

El análisis de los productos de amplificación se realiza mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa y visualización con agentes intercalantes fluorescentes.

5- Preparar un gel de agarosa al 2%.

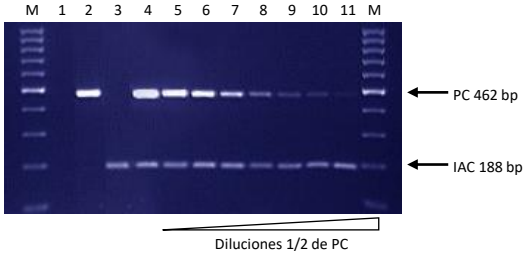
6- Cargar 14 µl del producto de reacción mezclado con el buffer de carga. Incluir carriles con marcador/es de peso molecular idóneos.

7- Migrar la electroforesis y verificar los productos de amplificación obtenidos.

Patrón de bandas esperado:

- Banda **PC**: 462 bp
- Banda **IAC**: 188 bp
- Banda *Mycoplasma spp.:* 435-470 bp (dependiendo de la especie presente en la muestra)

Figura 1. ***Patrón de Bandas***



Carriles M: 100 bp DNA Ladder

D. Interpretación de resultados

Muestra	Bandas visualizadas		Interpretación
	435-470 bp	188 bp	
Muestra + IAC	NO	NO	Falso negativo: inhibidor en la muestra o PCR inválida
	NO	**SI**	Ausencia de Mycoplasma (*Mollicutes)* en la muestra
	SI	NO	Alto contenido de Mycoplasma *(Mollicutes)* en la muestra, impide visualización del IAC
	SI	**SI**	Presencia de Mycoplasma *(Mollicutes)*
PC + IAC	NO	NO	PCR inválida
	NO	**SI**	Problema con el PC
	SI	NO	Problema con el IAC
	SI	**SI**	Patrón de bandas esperado
IAC	NO	NO	PCR inválida
	NO	**SI**	Patrón de bandas esperado
	SI	NO	Falso positivo: contaminación y problema con el IAC
	SI	**SI**	Falso positivo: IAC o agua contaminada
Control negativo (sin ADN)	NO	NO	Resultado esperado
	NO	**SI**	Falso positivo: agua contaminada
	SI	NO	Falso positivo: agua contaminada
	SI	**SI**	Falso positivo: agua contaminada

5. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Ausencia de amplificación en el PC

1. **ADN control degradado.** Utilizar una alícuota nueva de PC resuspendido. Recordar que el PC gelificado una vez resuspendido es recomendable conservarlo alicuotado, en viales de baja retención, a -20 °C a fin de evitar su deterioro por congelación/descongelación.
2. **Error de pipeteo.** Verificar que el PC ha sido incorporado al vial de reacción.
3. **Revisar la programación del termociclador.** Verificar que el programa de amplificación seleccionado ha sido el adecuado.
4. **Viales de Gelified Mix hidratados.** Verificar la ausencia de hidratación en los viales gelificados.

Ausencia de bandas específica y de IAC en la muestra

1. **Presencia de inhibidor de amplificación en la muestra.** Diluir la muestra con Tris 10mM pH 8.0 o con agua libre de nucleasas y repetir el ensayo. Si la cantidad de inhibidores es significativa puede extraer el ADN molde para evitar su interferencia.
2. **ADN de IAC degradado.** Utilizar una alícuota nueva de IAC resuspendido. Una vez resuspendido el control gelificado es recomendable conservarlo alicuotado en viales de baja retención a -20 °C a fin de evitar su deterioro por congelación/descongelación.
3. **Revisar la programación de la PCR** Verificar que el programa de amplificación seleccionado ha sido el adecuado.
4. **Viales de Gelified Mix hidratados.** Verificar la ausencia de hidratación en los viales gelificados.

Aparición de banda de *Micoplasma spp.* en el vial de IAC

1. **ADN de IAC contaminado.** Repetir el ensayo con una alícuota nueva de IAC; si la contaminación persiste resuspender un vial de IAC gelificado nuevo.
2. **Agua de reacción contaminada.** Repetir el ensayo con una alícuota nueva de agua libre de nucleasas.

Falta de reproducibilidad en los duplicados de la muestra

1. **Muestra no homogénea.** Centrifugar la muestra antes de pipetear y repetir el ensayo. Al pipetear evitar tocar el precipitado, rico en inhibidores de PCR. Al centrifugar también puede pasar el sobrenadante en un vial limpio.

6. APÉNDICE

Principales especies de *Mollicutes* detectadas por el **Mycoplasma *Gel Detection* Kit**:

A. laidlawii	*M. orale*
M. agalactiae	*M. pirum*
M. arginini	*M. pneumoniae*
M. arthritidis	*M. pulmonis*
M. bovis	*M. salivarium*
M. falconis	*M. spermatophilum*
M. fermentans	*M. synoviae*
M. hominis	*M. timone*
M. hyorhinis	*Spiroplasmas*
M. opalescens	*Ureaplasmas*