

# **PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA**

## **DISEÑO Y DESARROLLO DE UN KIT DE DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN POR MICOPLASMA EN CULTIVOS CELULARES**

**Farias Foresi, Leandro – LU1024072**

**Mestre, Diego – LU1034402**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dr. Prada, Federico - UADE**

Co-Tutor:

**Lic. Cardozo, Julián - UADE**

Colaborador:

**Dra. Cámara, María de los Milagros**

**Septiembre 16, 2016**



# **UADE**

## Contenidos

Agradecimientos.....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Micoplasma.....	8
1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	10
1.3. Antecedentes.....	12
1.4. Financiamiento del proyecto. ....	17
1.5. Objetivos.....	17
2. Materiales y métodos .....	20
2.1. Cultivo celular .....	20
2.2. Toma y preparación de muestras .....	22
2.3. Tinción de Hoechst .....	24
2.4. Preparación de Primers y ADN comercial.....	25
2.5. Preparación de master mix y protocolo de PCR .....	26
2.6. Preparación, siembra y revelado del gel de electroforesis.....	28
3. Resultados .....	32
3.1. Elección de secuencias para el diseño de primers.....	32
3.2. Diseño de primers.....	34
3.3. Ensayo con ADN genómico de micoplasma comercial .....	40
3.4. Límite de detección.....	42
3.5. Ensayo de detección con un cultivo celular contaminado .....	43
3.6. PCR múltiple en cultivo de línea celular contaminada .....	44
3.7. Ensayos de detección en cultivos celulares no contaminados .....	46
3.8. Cepas detectadas.....	49
4. Discusión.....	52
4.1. Límite de detección.....	52
4.2. Aparición de contaminaciones .....	52
4.3. PCR Multiplexada.....	53
4.4. Cantidad de primers a incluir en el kit.....	54
4.5. Toma de muestras .....	55
4.6. Primers descartados .....	55
4.7. Marcador molecular propio.....	56

---

4.8.	Tratamiento de las muestras .....	58
4.9.	Presentación final del kit .....	58
4.10.	Mejoras a futuro .....	60
5.	Conclusión .....	65
6.	Bibliografía .....	66
7.	Anexos .....	73
A	Descripción completa de PCR	
B	Manual de usuario	
C	Ficha de producto DMEM-F12	
D	Ficha de producto SFB	
E	Ficha de producto L-Glutamina	
F	Certificado de análisis ADN genómico <i>M. hominis</i>	
G	Marcador molecular Sigma 100bp Low Ladder	
H	Datos completos de los primers diseñados	

## Agradecimientos

Agradecemos a:

Dr. Federico Prada  
Dra. Milagros Cámara  
Dra. Diana Acosta  
Lic. Leandro Guttlein  
Lic. Julián Cardozo  
Lic. Ignacio Fernández  
Téc. Guillermina Zola  
Fundación Instituto Leloir

Por su colaboración en la realización del proyecto.

En especial queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a nuestras familias por el acompañamiento permanente y la motivación brindada durante el desarrollo de toda nuestra carrera.

## Resumen

Los cultivos celulares son ampliamente utilizados tanto a nivel industrial como en investigación científica y académica. Uno de los inconvenientes más frecuentes es la aparición de contaminaciones, ya sea con células no relacionadas como por microorganismos. Un género de microorganismos en particular, micoplasma, es particularmente difícil de evitar, detectar e incluso combatir. El tratamiento con antibióticos para la eliminación de micoplasma en cultivos infectados es un proceso largo y costoso, lo cual plantea la necesidad de métodos diagnósticos confiables y ágiles, que permitan la detección temprana de este tipo de contaminantes.

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar un kit que permita la detección de micoplasma en cultivos celulares en el ámbito académico y de investigación, pudiendo ser escalable también a nivel industrial. Para tal fin se empleó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) cuya sensibilidad es significativamente mayor a la de los otros métodos utilizados para la detección de micoplasma.

Para desarrollar el trabajo hemos diseñado una serie de primers sobre las secuencias 16s rRNA de micoplasma y beta actina de *Homo sapiens*. Éstos son los responsables de iniciar la amplificación de fragmentos de ADN que permiten identificar una contaminación por micoplasma, junto con un control interno de la reacción de PCR. La eficiencia de esta combinación de primers fue comprobada sobre ADN purificado de micoplasma y sobre muestras de cultivos celulares eucariotas con y sin presencia de contaminación por micoplasma.

Mediante este trabajo, hemos demostrado la posibilidad de desarrollar un producto altamente sensible para el control microbiológico de cultivos celulares, de producción nacional, el cual podrá ser utilizado dentro de cualquier laboratorio.

Asimismo, el kit generado podrá ser utilizado en los UADE Labs, especialmente en el laboratorio de cultivos celulares, para detectar de manera temprana contaminaciones con micoplasma y, de esta forma, validar los resultados obtenidos en los ensayos que involucren líneas celulares.

**Palabras clave: cultivos celulares - micoplasma - detección - PCR - contaminación.**

## Abstract

Cell cultures are widely used several industry fields, as well as in scientific and academic research. One of the most frequent problems associated with these are contaminants, whether it is unwanted cell lines or other microorganisms growing alongside with the intended cell line. One genus of such microorganisms in particular, mycoplasma, is particularly difficult to avoid, detect and even eradicate. Antibiotic treatment of these contaminated cultures is a long and expensive process, which brings forth the need of a quick and reliable method of detection which allows early diagnosis of such contaminants.

The objective of the present study is to develop a kit that allows detection of mycoplasma in cell cultures, both in academic and research environments, with the possibility to scale it up for industrial usage in the future. To this end, the PCR (Polimerase Chain Reaction) technique was used, for it has a significantly higher sensitivity than other methods used in mycoplasma diagnose.

As we developed this kit, a series of primers were designed with micoplasma's 16s rRNA sequence, along with *Homo sapiens* actin beta sequence. These would be responsible to initiate the DNA fragment amplification which will later be used to identify mycoplasma contamination and PCR internal control, respectively. The efficiency on this combination of primers was corroborated over purified mycoplasmal DNA, and later with eukaryotic cell cultures with and without mycoplasma contamination.

With this study, we have proven the possibility to develop a highly sensitive product for its use in microbiological control of cell cultures, produced locally, which could be used in any laboratory.

Morover, this kit could be used in UADE Labs facilities, specially in cell culture laboratory, to early detect mycoplasma contamination, in order to validate results obtained by the use of cultured cells.

**Key words: Cell Culture - Mycoplasma - Detection - PCR - Contamination.**

## 1. Introducción

Los cultivos celulares de cualquier laboratorio deben ser controlados periódicamente para que el mismo crezca bajo las condiciones óptimas establecidas. Durante estos controles se busca que todos los nutrientes se encuentren en las concentraciones necesarias para el correcto desarrollo celular, a la vez que se controla que la única línea celular presente sea la estudiada. Las instalaciones del laboratorio en el que se desarrolla y estudia el cultivo deben ser estériles, para que los cultivos no se contaminen con líneas celulares indeseadas (conocido como contaminación cruzada), ni con bacterias, hongos o incluso virus. Evitar esta contaminación es fundamental, cualquiera sea el propósito del cultivo celular, aunque no siempre resulta fácil de lograr. En particular, uno de los contaminantes más comunes en cultivos de células eucariotas es la presencia de micoplasma (Armstrong SE *et al*, 2010 y Hwang J. *et al*, 2012). Este microorganismo procariota parasita las células afectando su normal desarrollo y comportamiento, modificando la morfología normal de las células, su ciclo celular y agotando los nutrientes del medio de cultivo, entre otros problemas (Rottem S y Barile MF, 1993). Siendo la lista de síntomas tan extensa e inespecífica, la contaminación no es fácilmente identificable por medios microscópicos. Los métodos más utilizados hoy en día para identificar este microorganismo en un cultivo utilizan tinciones (DAPI o Hoechst), para resaltar así la presencia del material genético del micoplasma en contraste con el material genético de la célula. Estos métodos son relativamente sencillos y su duración aproximada es de 24hs. La principal ventaja que presentan, es que los protocolos son de muy baja complejidad, pudiendo ser ejecutados e interpretados por cualquier persona en el laboratorio y que su costo es inferior a los métodos más complejos disponibles. Sin embargo, los resultados son poco sensibles y no son específicos, sino que se vale únicamente de la propiedad de estos colorantes de resaltar material genético dentro y fuera del núcleo celular.

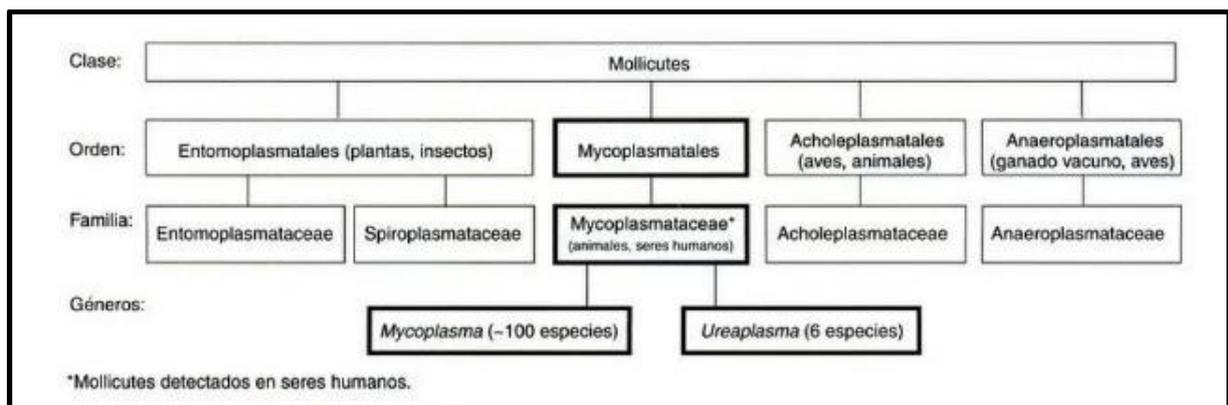
En contrapartida a estos métodos, existen ensayos específicos diseñados para la identificación temprana de este contaminante, uno de los cuales es la PCR (del inglés “Polimerase Chain Reaction”). Este método ofrece un resultado en un período de tiempo razonablemente corto (entre 4 y 5 horas en total), y es totalmente específico para la identificación de este problema, además de aumentar exponencialmente la sensibilidad del ensayo. Los kits comerciales disponibles actualmente en el mercado son de origen extranjero, por lo que es necesario importarlos a Argentina desde el exterior. Esta condición implica que

el costo de adquirir dichos kits sea en muchos casos un limitante, teniendo que recurrir a ensayos más económicos y menos efectivos. Por otra parte, siendo la política económica de Argentina tan variable respecto de las importaciones de productos extranjeros, resulta evidente la necesidad de un producto de origen nacional que pueda cumplir con las exigencias de la demanda local, entregando un kit de alta calidad y en un período de tiempo razonable.

Describiremos en detalle a lo largo del presente trabajo las características del microorganismo micoplasma y de la contaminación de cultivos por este microorganismo, las bases científicas que apoyan la robustez del método de PCR para su identificación, y la importancia de los controles periódicos y precisos sobre cultivos celulares. Por último, presentaremos el kit diseñado y desarrollado para detectar este microorganismo, discutiendo las dificultades y aciertos que dieron forma a la versión final del mismo.

### 1.1. Micoplasma

El género micoplasma pertenece a la familia *mycoplasmataceae*, y actualmente contiene más de 100 especies reconocidas. Se sabe que al menos 15 de ellas son capaces de colonizar al humano de forma crónica, siendo varias de ellas a su vez patogénicas para éste (Fig. 1).



**Figura 1.** Taxonomía de la clase Mollicutes. Fuente: Bailey, S., *Diagnóstico Microbiológico*, 2009.

Son organismos unicelulares procariotas pequeños, cuyas dimensiones comprenden entre 125nm a 0,8µm dependiendo la especie, y todas ellas carecen de pared celular rígida (Drexler HG y Uphoff CC, 2002). Esta característica los hace particularmente resistentes a los

antibióticos comúnmente utilizados para combatir bacterias, tales como los betalactámicos (que incluyen penicilinas y cefalosporinas entre otros), cuyos mecanismo de acción inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana. Como contrapartida, el citoplasma se encuentra rodeado de una membrana celular de tres capas la cual contiene esteroides, algo muy inusual en células procariotas. Esta estructura externa laxa explica la gran variedad de formas que pueden tomar las distintas cepas de este microorganismo, fenómeno conocido como pleomorfismo.

El pequeño tamaño de las células de micoplasma y su morfología variada dificulta el estudio y la caracterización de las colonias que forman, a la vez que las condiciones poco usuales de crecimiento obstaculiza el cultivo de este microorganismo en medios libres de células. Son estas mismas condiciones las que favorecen la contaminación por micoplasma, y dificultan a su vez la identificación de dichas contaminaciones en cultivos celulares, especialmente a bajas concentraciones, lo que plantea la necesidad de métodos más sensibles y específicos de detección.

Las colonias de micoplasma que consiguen contaminar un cultivo celular, normalmente lo parasitan. Las células de mamíferos son especialmente susceptibles a este tipo de contaminación, dada la gran afinidad que existe entre su membrana y la de micoplasma. La gran mayoría de las especies que se han caracterizado infectan las células adhiriéndose a su membrana desde la cara extracelular, aunque se han encontrado evidencias de algunas otras especies que logran penetrar la membrana y sobrevivir como parásitos intracelulares (Yavlovich A. *et al*, 2004). Los efectos sobre el normal desarrollo del cultivo son igualmente variados. Se ha descrito inhibición en la proliferación celular, incremento en la muerte celular, fragmentación del ADN, cambios morfológicos característicos de apoptosis, alteraciones en el ciclo celular, bajo rendimiento de biomasa y alteraciones metabólicas tales como la actividad de la arginina deaminasa entre otros (Nikfarjam L, Farzaneh P., 2012). Este amplio listado de síntomas posibles dentro de un mismo cultivo celular son muy perjudiciales tanto para el ámbito de investigación, como en la producción de biomoléculas y biofármacos a nivel industrial. En el primer caso, los cambios morfológicos y de desarrollo celular normal impiden la estandarización de protocolos robustos, haciendo imposible una validación de resultados por falta de repetitividad. En la industria, por otro lado, los bajos rendimientos de biomasa y la alteración del metabolismo esperado van en desmedro de los rendimientos del producto, resultando en importantes pérdidas económicas. Cualquiera sea el ámbito de

aplicación del cultivo celular, la heterogeneidad de los síntomas que presentan los cultivos contaminados por micoplasma evitan una rápida y precisa detección por los métodos habituales de control de calidad de los mismos.

Si un cultivo contaminado logra ser diagnosticado, su tratamiento es igualmente problemático. Siendo este microorganismo resistente a muchos de los antibióticos comúnmente utilizados, se deben utilizar otras variantes. Los antibióticos más comunes para combatir esta contaminación son de la familia de los macrólidos cuyo mecanismo de acción ataca la síntesis proteica de la porción 50s ribosomal. La eritromicina es el antibiótico más utilizado de esta familia, junto con sus derivados azitromicina y claritromicina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el cultivo celular que se intenta proteger tiene un objetivo concreto, ya sea para investigación académica o con fines industriales. Con este propósito en mente, se debe decidir si el agregado de antibióticos tendría un impacto negativo en el producto final, y al mismo tiempo evaluar si este riesgo vale la pena frente a la alternativa de desechar los cultivos contaminados. Si bien esta última alternativa parece algo extrema, el riesgo de propagar la contaminación a otros cultivos, o incluso a los stocks de líneas celulares sanas es muy alto, y sus consecuencias serían mucho más graves. Sin dudas, estas decisiones deben analizarse caso por caso en cada laboratorio, aunque cualquiera sea el caso resulta evidente que la detección temprana de micoplasma en un cultivo celular es una información por demás valiosa.

## 1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de la descripción original de la técnica (Randall K. *et al*, 1985), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido incansablemente estudiada y utilizada a nivel mundial. Esta técnica consiste en un procedimiento sencillo para la replicación de fragmentos específicos de ADN a partir de una cantidad mínima de muestra, haciendo uso del mecanismo natural de replicación del material genético que realizan los organismos vivos. La utilidad y aplicación de esta herramienta es muy versátil, dado que permite amplificar pequeñas trazas de muestras de ADN disponible de manera específica, pudiendo luego utilizar estos fragmentos amplificados en numerosos ensayos biológicos. Es así como la técnica puede utilizarse para detectar mutaciones en secuencias de ADN, identificar ausencia o presencia de secuencias específicas, introducir mutaciones específicas en secuencias génicas (conocido

como mutagénesis dirigida), colocar fragmentos ajenos a los fragmentos que se busca amplificar, utilizados luego como sitios de acción para otras enzimas accesorias, o incluso para diseñar e ingenierizar proteínas para facilitar enormemente su purificación a partir de un cultivo celular, para mencionar solo algunos usos.

El procedimiento de PCR consta de en una serie de ciclos de incrementos y descensos de temperatura, lo cual permite que unas pequeñas sondas de ADN previamente diseñadas, llamadas primers, interactúen con material genético presente en la muestra. La polimerasa es la enzima encargada de extender los primers, siguiendo como molde la cadena de ADN de la muestra, polimerizando así la cadena complementaria a ésta. Cada ciclo toma como punto de partida el material genético disponible en el tubo de reacción, y lo multiplica. La ventaja del método es que logra amplificar un fragmento de ADN de interés de manera altamente específica, de modo tal que éste se multiplica selectivamente a partir de la muestra. A esta multiplicación del fragmento de interés, o “amplicón”, se la conoce como amplificación exponencial. Para lograr esta amplificación específica, se debe contar con algo de información acerca de la secuencia de ADN del fragmento de interés previamente, para poder diseñar correctamente los primers que permitirán esta reacción en cadena.

A la hora de diseñar un ensayo por PCR se deben tener en cuenta ciertos aspectos clave. La temperatura de cada ciclo, su duración, y la cantidad de veces que debe repetirse el ciclo son parámetros que deben ponerse a punto para cada ensayo en particular, ya que modifican drásticamente los resultados. Por otra parte, el diseño de los primers in-sílico es probablemente el punto más importante durante los primeros pasos del diseño experimental, y existen múltiples conceptos a tener en cuenta. La descripción de estas técnicas, junto con otras consideraciones de interés, han sido detalladas en el **Anexo A**, y constituyen los pilares teóricos tenidos en cuenta a lo largo del presente desarrollo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una herramienta muy poderosa para lograr amplificar material genético de manera específica, aunque posee una ligera desventaja frente a los métodos colorimétricos: finalizada la reacción, el ensayo de PCR no genera un resultado inmediato. Para determinar si la reacción funcionó tal como lo esperado, y verificar el resultado de la misma, se debe realizar un segundo ensayo llamado electroforesis en gel de agarosa. Para este ensayo, se construye una red de agarosa (un polisacárido de galactosa) por la cual el ADN podrá migrar, impulsado por la atracción eléctrica de dos electrodos conectados a cada extremo de la cuba que lo contiene. El esqueleto de fosfatos del ADN

posee una carga negativa bajo las condiciones del ensayo, y esto se aprovecha para que éste migre hacia el electrodo positivo colocado en el otro extremo del gel. De esta manera, los fragmentos más cortos de ADN migrarán rápidamente entre las hebras del gel atraídas por su carga opuesta, mientras que los fragmentos más largos lo harán con mayor dificultad debido al impedimento físico que las fibras de agarosa imponen. La distancia a la que migran los fragmentos al finalizar la electroforesis es inversamente proporcional al tamaño de los mismos, y esta relación se mantiene constante para todos los fragmentos presentes en la muestra. Con esto en mente, y colocando una muestra de fragmentos de ADN de tamaños estándar como referencia, puede determinarse el tamaño de un fragmento por comparación de la distancia recorrida con aquella recorrida por el marcador molecular de referencia.

La manera más habitual de visualizar los fragmentos de ADN en el gel es utilizando un fluoróforo que interactúe con el material genético, revelando así las posiciones con altas concentraciones de ADN en el gel, llamadas bandas. El fluoróforo más utilizado es el Bromuro de Etidio, el cual actúa como intercalante de ADN. Este compuesto aromático se ancla entre las hebras del ADN de doble cadena en la muestra, y fluoresce con un color anaranjado al ser irradiado por luz ultravioleta (UV). Su fluorescencia en ausencia de ADN es 20 veces menor, por lo que la visualización de una banda anaranjada en el gel es una clara señal de presencia de material genético.

### **1.3. Antecedentes**

Desde sus inicios, la técnica de PCR en sus distintas variantes ha sido ampliamente utilizada para la detección de contaminantes biológicos. Las muestras estudiadas son también muy variadas en cuanto a su origen y tipo de células, encontrando tanto células animales como vegetales provenientes de tejidos vivos y de cultivos crecidos *in vitro*. Para ilustrar este punto hemos listado los trabajos más relevantes encontrados en la bibliografía, los cuales dan cuenta de cómo fue se fue incorporando la técnica de PCR a ensayos diagnósticos a través de la historia. A partir de este listado puede verse como la técnica de PCR ha tomado más protagonismo en diagnósticos cada vez más relevantes, que abarcan temas tan sensibles como la salud animal en agricultura y salud pública, hasta los ensayos más habituales realizados en el control de calidad de alimentos de consumo masivo.

Para iniciar el recorrido de la PCR, podemos mencionar que en 1988 se utilizó la técnica de PCR para amplificar una región de ADN de la bacteria *Pseudomonas cepacia* (bacteria que degrada herbicidas) con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección del organismo por análisis dot-blot en muestras ambientales (Steffan, R. J., & Atlas, R. M., 1988). En 1990, la misma técnica tradicional se utilizó para la detección de *Shigella flexneri* en cultivos de lechuga (Lampel, K. A. et al, 1990) y para la detección de adenovirus en muestras de heces (Allard, A. et al, 1990). Al año siguiente, se la empleó para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en muestras de sangre seca (Cassol, S. et al, 1991). En 1992 fue utilizada como un método de diagnóstico rápido y biológicamente seguro de la infección por virus de la peste porcina africana (VPPA) empleando muestras de órganos y plasma obtenidos de cerdos infectados por el VPPA así como cultivos de células infectadas por el mismo virus (Steiger, Y. et al, 1992). También en 1992, se emplea para detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras clínicas de biopsias gástricas humanas (Clayton, C. L. et al, 1992) y para detectar contaminación por *Mycoplasma pneumoniae* en muestras clínicas de pacientes pediátricos (Skakni, L. et al, 1992). En 1993, la reacción en cadena de la polimerasa demostró ser una herramienta rápida y sensible para la detección de herpesvirus bovino tipo 1 en semen de bovino (Van Engelenburg, F. A. et al, 1993) y para la detección de los genes de degradación de bifenilo policlorado en sedimentos contaminados (Erb, R. W. y Wagner-Döbler, I., 1993). Un año después, en 1994, la PCR fue la técnica empleada para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras clínicas y ambientales a partir de muestras de agua, mediante la amplificación de una región del gen de la exotoxina A (Khan, A. A. y Cerniglia C.E., 1994). Ya hacia 1995, la PCR se utilizó para detectar e identificar micobacterias, mediante la amplificación del ADN que codifica el 16S rRNA, en muestras clínicas tales como lavado broncoalveolar, muestras de biopsias de tejido, líquido cefalorraquídeo, pus, líquido peritoneal, líquido pleural, y sangre (Kox, L. F. et al, 1995). En 1996, se la usó para la detección de *Cryptosporidium parvum* en leche cruda (Laberge, I. et al, 1996) y hacia 1997 para la detección del gen de la toxina de difteria, en muestras de pacientes con infecciones en el tracto respiratorio (Nakao, H. y Popovic, T., 1997) y para la detección de la presencia de enteropatógenos en agua (Purohit et al, 1997). Un año más tarde, fue empleada para la detección de células microbianas y esporas en muestras de suelo (Kuske, Cheryl R. et al, 1998) y para la detección e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 5, en muestras de tejidos pulmonares obtenidos a partir de cerdos

infectados (Lo, Terry M. *et al*, 1998). En 1999, la PCR se empleó para la detección de *Salmonella spp.* y de *Listeria monocytogenes* en residuos orgánicos domésticos (Burtscher, Carola *et al*, 1999). En el año 2000, dada la importancia de los análisis por PCR para la detección de contaminantes en alimentos, se llevó a cabo un trabajo que determinó que la presencia de colágeno inhibe la reacción de PCR en la detección de *Clostridium perfringens* (Kim, Sangburn *et al*, 2000).

La utilización de la PCR en este punto se encuentra ampliamente reconocida como método diagnóstico, aunque la regulación de su uso aún no ha sido desarrollada del todo. Surge entonces un estudio en 2001 del Centro de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Instituto de Patología Clínica e Investigación Médica en Westmead, Nueva Gales del Sur, Australia, donde se demuestra que no todos los set de primers mencionados en publicaciones científicas poseen la especificidad de especie que les atribuyen sus autores. Éste es un llamado de atención para la comunidad científica, dejando en claro que la importancia de la PCR como herramienta confiable de diagnóstico debe apoyarse en bases sólidas y muy confiables (Kong, Fanrong *et al*, 2001).

Hacia el año 2003, en la bibliografía comienzan a aparecer más trabajos de diagnóstico utilizando otras variantes a la PCR convencional. Por ejemplo, se utilizan las técnicas de RT-PCR (transcripción inversa) y q-PCR (real time PCR) para la rápida detección y cuantificación de levaduras y mohos viables como contaminantes en yogures y productos alimenticios pasteurizados (Bleve, Gianluca *et al*, 2003). En 2004, se emplean tanto la PCR convencional como la qPCR para la detección y cuantificación de *Wallemia Sebi* en aerosoles (Zeng, Qing-Yin *et al*, 2004) y en el año 2005 se emplea la qRT-PCR para la detección de enterovirus en aguas naturales de áreas de recreación (Fuhrman, Jed A. *et al*, 2005). Posteriormente, en 2006, vuelven a utilizarse tanto la RT-PCR como la q-PCR para la detección y recuento de levaduras totales de vino (Hierro, Núria *et al*, 2006) y en el año 2007, se emplea la qRT-PCR multiplex para la detección de norovirus humanos y animales en muestras clínicas y ambientales (Wolf, Sandro *et al*, 2007). Dos años más tarde, se realiza la detección de *E. Coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio Cholerae*, y *Campylobacter spp.* mediante tres reacciones de PCR multiplex (Gómez-Duarte *et al*, 2009) y la detección de micoplasma en varias líneas celulares de mamíferos, incluyendo humanos, monos, ratones y hámster (Molla Kazemiha, Vahid *et al*, 2009). En el año 2010, se utiliza la técnica de RT-PCR para la detección y cuantificación de *Bacillus cereus* en leche

(Oliwa-Stasiak *et al*, 2010) y en 2011 se realiza un estudio que demuestra que varios reactivos comerciales para RT-PCR se encuentran contaminados con el virus de la leucemia murina o ADN de ratón (Zheng, HaoQiang *et al*, 2011). Al año siguiente, se realiza la comparación de 2 métodos de PCR para la detección de patógenos en botellas (Jeng, Kevin *et al*, 2012) y en 2013 se realiza la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne y leche obtenidas de diversas granjas, lecherías y carnicerías en Bareilly, India (Khan, J.A. *et al*, 2013). En el 2014, se emplea nuevamente la qRT-PCR para la detección y cuantificación de *Lactococcus lactis* a lo largo de la maduración de los quesos (Ruggirello *et al*, 2014) y en 2016 se vuelve a utilizar la PCR convencional para la detección de *Burkholderia multivorans* en agua y muestras de suelo (Peeters *et al*, 2016).

En la actualidad, y puntualmente para el diagnóstico de micoplasma, existen distintos sistemas para detección tales como la tinción de ADN usando DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), tinción de Hoechst, hibridación de ácidos nucleicos con una sonda específica para micoplasma rRNA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con anticuerpos específicos para micoplasma, PCR convencional y Real Time PCR. Algunos de estos métodos se encuentran disponibles comercialmente y otros tantos han sido desarrollados y descritos en publicaciones científicas como trabajos de investigación o como parte integral de éstos.

Dada las características de nuestro proyecto, nos dedicaremos a presentar aquí sólo aquellos trabajos concernientes a la metodología de PCR convencional, prestando especial atención a aquellos kits para detección de micoplasma que se encuentren disponibles comercialmente y mencionaremos algunos trabajos publicados en bases de datos públicas.

- Situada en Corea, la empresa INTRON BIOTECHNOLOGY produce y comercializa su producto e-Myco™ plus mycoplasma PCR detection kit, el cual se presenta en un único tubo premixado. Como control positivo utilizan ADN de una secuencia parcial de 16s rRNA de *M. hyorhins* y aseguran la detección de 49 cepas de micoplasma.

Fuente: <http://www.intronbio.com>.

- En EE.UU, la empresa ATCC, produce y comercializa su producto universal mycoplasma detection kit (ATCC® 30-1012K™). Este producto se basa en la reacción de PCR para la detección de 60 cepas de micoplasma. Sus primers

amplifican fragmentos de la región 16s rRNA de micoplasma los cuales se visualizan como bandas que van desde los 434 pb hasta los 468 pb en un gel de agarosa.

Fuente: <https://www.atcc.org>

- Otra empresa de origen coreano, la empresa CellSafe, provee servicios de testeo de micoplasma, kits de diagnóstico y servicios de consultoría a compañías farmacéuticas. Su producto BioMycoX micoplasma PCR detection kit está compuesto por una pre-mix de primers, una pre-mix de per y un control positivo. La presencia de micoplasma se evidencia en un gel de agarosa con bandas que oscilan entre 250 pb y 300 pb y su control positivo muestra una banda de 700 pb.

Fuente: <http://www.cells-safe.com>

- La compañía BI-Biological Industries, con sedes en EE.UU e Israel, produce y comercializa EZ-PCR micoplasma Test kit. Este producto se presenta con una mix completa para micoplasma que incluye una variedad de primers, dNTP's y Taq Polimerasa. La banda que evidencia la presencia de ADN de micoplasma en un gel de agarosa es de 270 pb. Incluye un tubo con el correspondiente control positivo.

Fuente: <http://www.bioind.com>

- La oferta internacional de kits para detección de micoplasma es amplia, y cada uno de los productos ofrecidos tiene sus propias características que les distinguen del resto de sus competidores. Los productos comercializados por estas empresas difieren entre sí en cuanto a su presentación, contenidos del kit, tratamiento de las muestras, tiempos de ejecución, interpretación de resultados entre otros, pero, en esencia, todos ellos se basan en el mismo principio, la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR convencional. Las empresas más destacadas son B & M Labs, S.A. (<https://biotechspain.com/es/index.cfm>), Innoprot (<http://www.innoprot.com>), Genlantis Inc. (<http://www.genlantis.com>), GeneCopoeia Inc. (<http://www.genecopoeia.com>), Applied Biological Materials Inc. (<http://www.abmgood.com>), Norgen Biotek Corp.

(<https://www.norgenbiotek.com>), PromoCell (<http://www.promokine.com>) y Sigma-Aldrich Co (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Respecto a los sistemas de detección de micoplasma no comerciales que pueden encontrarse en bases de datos públicas y sitios de acceso libre y gratuito, podemos mencionar trabajos como “PCR-based detection and eradication of micoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience” (Mahmood Jeddi Tehrani, et al, 2009), “Advances in PCR based Detection of micoplasmas Contaminating Cell Cultures” (Georges Rawadi and Olivier Dussurget, 1995) y “Detection of micoplasma genitalium by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene” (Jørgen Skov Jensen et al, 2003). A diferencia de los productos comerciales, estos trabajos brindan toda la información relevante acerca de sus desarrollos y, al igual que los productos comerciales, basan sus métodos en la amplificación de ADN mediante la técnica de PCR convencional.

#### **1.4. Financiamiento del proyecto.**

El financiamiento del proyecto se logró a través de un pedido de subsidio a UADE (ACyT A15T11). Mediante dicho subsidio se realizó la compra de un total de 6 pares de primers para la amplificación de distintos fragmentos de ADN de micoplasma y 3 pares de primers para la amplificación del fragmento de ADN utilizado como control interno de la PCR. También se pudo lograr la importación de ADN de micoplasma purificado, el cual fue utilizado como control positivo en las pruebas de laboratorio.

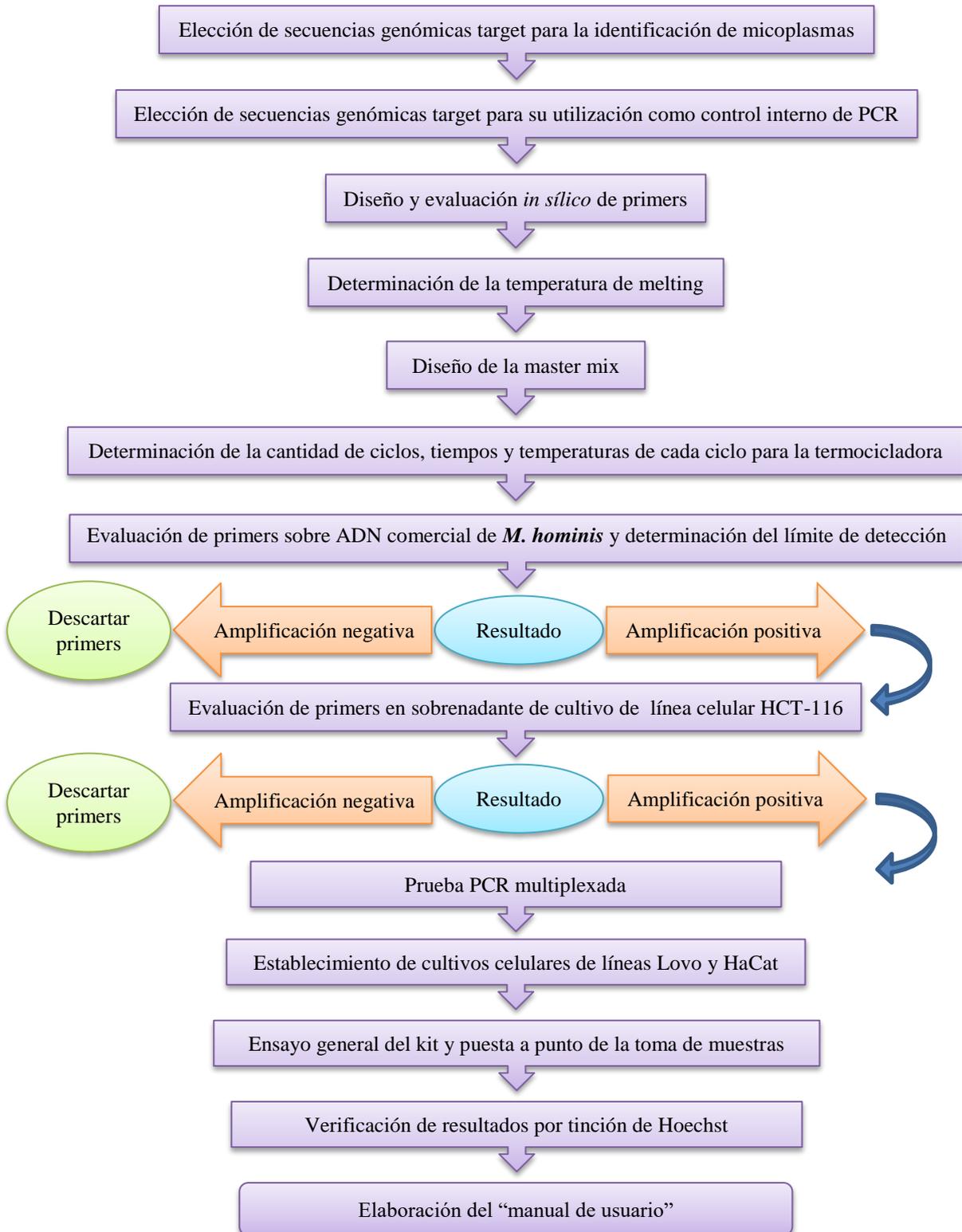
#### **1.5. Objetivos**

- Objetivo principal

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar un kit que permita la detección de micoplasma en cultivos celulares en el ámbito académico y de investigación, pudiendo ser escalable también a nivel industrial. Para tal fin se empleará la técnica de PCR cuya sensibilidad es significativamente mayor a la de los métodos que involucran tinciones celulares, utilizadas actualmente para la detección de dicho contaminante.

- Objetivos secundarios
  - I. Evaluar cuál sería la secuencia génica más conveniente para identificar micoplasma de forma específica, lo cual se desprenderá del análisis del genoma de dicho organismo mediante el uso de bases de datos públicas;
  - II. Diseñar primers adecuados, una vez elegida la secuencia génica target, utilizando software de uso libre disponible en internet;
  - III. Una vez obtenidos los diseños, adquirir dichos primers;
  - IV. Diseñar un protocolo adecuado para la toma de muestras de cultivos celulares.
  - V. Testear la efectividad de dicho protocolo, y ponerlo a punto.
  - VI. Poner a punto los parámetros de la PCR (cantidad de ciclos, duración y temperatura de cada ciclo, cantidad de muestra y primers necesaria), a fin de obtener un protocolo de trabajo reproducible con resultados concluyentes.
  - VII. Presentar una versión terminada del desarrollo, en el cual se detalle el contenido del kit y su presentación final. Adjuntar un “manual de usuario” donde se describa el procedimiento de uso del kit y las principales características del mismo.

Los objetivos, en forma esquemática y secuencial, se muestran en la **Fig. 2**.



**Figura 2:** Esquema secuencial de objetivos.

## 2. Materiales y métodos

La totalidad de los materiales y métodos que describiremos a continuación han sido resumidos en el **Anexo B**. El mismo representa el manual de usuario que sería entregado a los clientes que obtengan el kit para obtener información de uso, interpretación de resultados y resolución de problemas durante el diagnóstico de cultivos celulares.

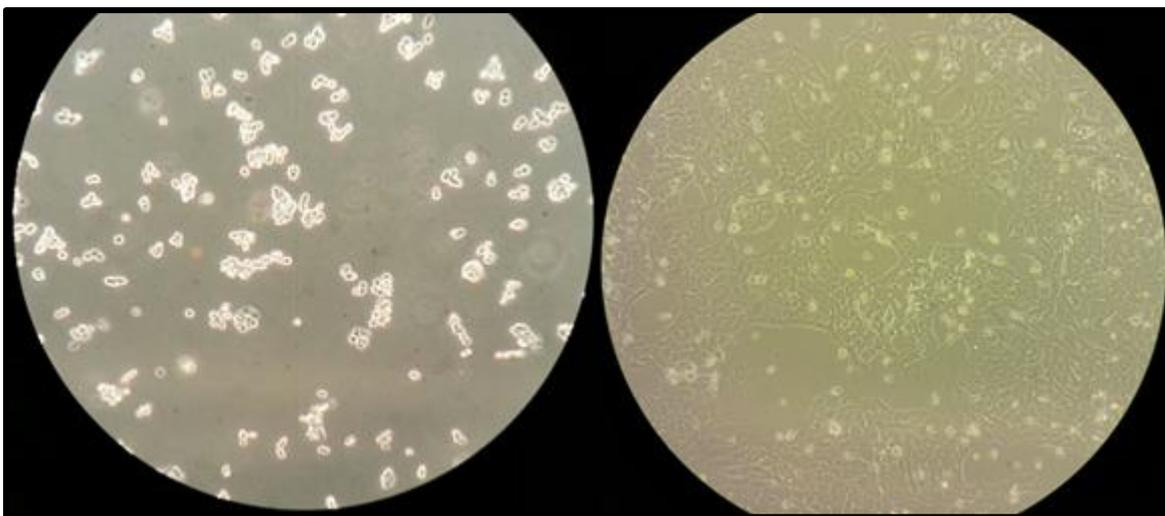
### 2.1. Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas durante el trabajo fueron LoVo, HaCat y HCT-116, siendo las dos primeras cultivadas en el laboratorio de cultivos celulares (UADE Labs, 9<sup>no</sup> piso). La última línea fue cortesía del Dr. Eduardo Cafferata del laboratorio de Terapia molecular y celular del Instituto Leloir. La línea celular HCT-116 se encontraba contaminada por micoplasma al momento de recibir la muestra, tal como fue determinado por un ensayo de Hoechst en el laboratorio de origen. Para asegurar que los cultivos de las líneas HaCat y LoVo se encontraran libres de contaminación se los creció bajo flujo laminar extremando los cuidados a tal fin. Los mismos también fueron verificados por tinción de Hoechst para comprobar la ausencia de micoplasma. Estos cultivos se plaquearon en placas de Petri con medio de cultivo DMEM-F12, 10% de SFB y suplementado con glutamina, y fueron incubados a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (se adjuntan los certificados de estos reactivos en los **Anexos C, D y E**). Los cultivos fueron monitoreados diariamente en microscopio de inversión para verificar su normal desarrollo.

Si bien el origen de las líneas no resultan determinantes para el desarrollo del presente trabajo, se describirá muy brevemente las características fundamentales de las mismas a continuación.

#### **Células LoVo**

La línea celular LoVo se inició en 1971 a partir de un fragmento de un nódulo tumoral metastásico en la región supraclavicular izquierda, de un paciente de sexo masculino de 56 años de edad de raza caucásica con un diagnóstico demostrado histológicamente de adenocarcinoma de colon. Su morfología es epitelial y en cultivo se desarrollan en adherencia. Poseen un nivel de bioseguridad S1 (Fig. 3).



*Figura 3. Micrografía de un cultivo celular de una línea LoVo, crecido en UADE Labs. A la izquierda, baja confluencia. A la derecha, alta confluencia. Aumento 200x.*

**Células HaCat:**

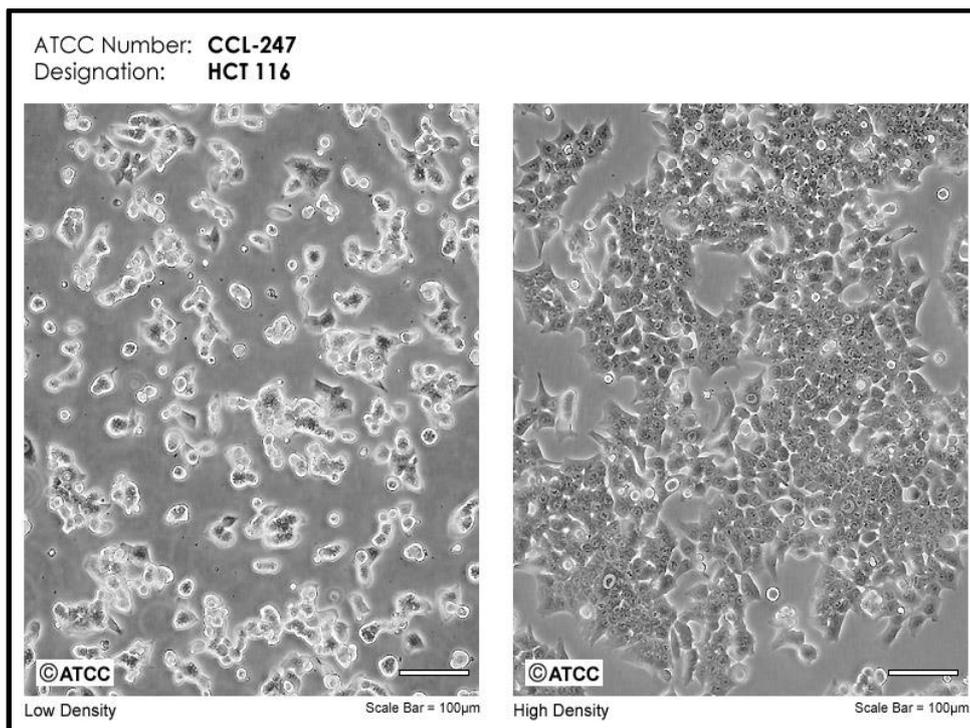
Son queratinocitos provenientes de piel humana histológicamente normal, los cuales, *in vitro*, se han transformado espontáneamente al ser sometidos a tratamiento térmico (Petra Boukamp *et al*, 1988). Ampliamente utilizadas en investigación, crecen en adherencia cuando son cultivadas y poseen nivel de bioseguridad S1 (Fig. 4).



*Figura 4. Micrografía de un cultivo celular de una línea HaCat crecida en UADE Labs. A la izquierda, baja confluencia. A la derecha, alta confluencia. Aumento 200x.*

### **Células HCT-116:**

Son células epiteliales de carcinoma colorectal humano. Ampliamente utilizadas en trabajos de investigación, crecen en adherencia y poseen nivel de bioseguridad S1. La **Fig. 5** ilustra microscopías de esta línea celular en baja y alta confluencia.



**Figura 5.** Micrografía de un cultivo celular de una línea HCT-116. A la izquierda, baja confluencia. A la Derecha, alta confluencia. Fuente: <https://www.atcc.org>

## **2.2. Toma y preparación de muestras**

Las muestras fueron tomadas a partir de cultivos celulares crecidos hasta una confluencia mayor o igual al 90%. Alcanzado este punto, se ejecutó el protocolo presentado a continuación.

1. Raspar la base de la placa de cultivo con la punta de una pipeta estéril (**Fig. 7**).
2. Verificar el desprendimiento celular por medio de un microscopio de inversión. Si el raspado no fuera suficiente para lograr un desprendimiento celular evidente al microscopio, repetir el paso anterior (**Fig. 8**).

3. Tomar todo el sobrenadante con ayuda de un pipetaid y colocarlo en un tubo Falcon estéril.
4. Calentar la muestra en un baño termostático a 95°C durante 10 minutos.
5. Dejar enfriar la muestra hasta alcanzar la temperatura ambiente.

**Nota:** Si la muestra no será utilizada inmediatamente, una vez alcanzada la temperatura ambiente almacenarla a -20°C para su uso posterior.

6. Tomar 1ml de sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf de 1,5ml de capacidad. Centrifugar a 13400 r.p.m. durante 30 segundos.
7. Cuidadosamente y sin desprender el pellet tomar 950µl con ayuda de una micropipeta y colocarlos en otro tubo eppendorf estéril.
8. La muestra así tratada está lista para ser usada en la reacción de PCR.



**Figura 6.** Laboratorio de cultivos celulares, 9no piso de los UADE Labs. Se observa el flujo laminar vertical utilizado y el microscopio de inversión a la derecha de la imagen.



**Figura 7.** Proceso de toma de muestras. Izquierda: raspado para el levantamiento de células; Centro: toma del sobrenadante; Derecha: colocación del sobrenadante en un tubo Falcon para posterior tratamiento térmico.



**Figura 8.** Micrografías del cultivo celular de la línea LoVo. Izquierda: placa inalterada; centro: luego de un proceso de raspado; derecha: luego de un segundo proceso de raspado, previo a la toma del sobrenadante. Aumento 200x.



**Figura 9.** Equipamiento utilizado en el tratamiento de las muestras. A la izquierda, Baño termostático Vicking. A la derecha, microcentrífuga marca Eppendorf.

### 2.3. Tinción de Hoechst

Los cultivos celulares crecidos en UADE Labs (líneas celulares LoVo y HaCat) fueron sometidos a ensayos Hoechst para verificar la ausencia de micoplasma. Para esto se utilizó un microscopio de fluorescencia para revelar los resultados. El protocolo seguido para la tinción fue el siguiente:

1. Colocar un cubreobjetos de vidrio limpio sobre el fondo de un pocillo de un multiwell estéril.
2. Cultivar la línea celular con 1,5ml de medio fresco en los pocillos preparados en el paso anterior por 2hs.

3. Agregar 10µl de reactivo de Hoechst, e incubar 1hs en estufa a 37°C.
4. Remover el medio de cultivo y descartar.
5. Fijar las células con paraformaldehído (PFA) 4% en buffer PBS. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Realizar dos lavados con PBS de 2ml cada uno, descartando el enjuague.
7. Retirar cuidadosamente el vidrio cubreobjetos del fondo del pocillo, y colocarlo sobre un portaobjetos.
8. Observar al microscopio de fluorescencia con aumento 400x, irradiando la muestra con  $\lambda = 350\text{nm}$ .

Este procedimiento tiñe el material genético presente en la muestra de un color cian. Si la muestra se encuentra contaminada, se observarán numerosas señales positivas (color cian) pequeñas fuera del núcleo celular, lo que es interpretado como células de micoplasma que se encuentran parasitando a esa célula.

## 2.4. Preparación de Primers y ADN comercial

Todos los primers elegidos fueron comprados a empresas especializadas (Invitrogen y Oligo). Éstos se encontraban liofilizados desde el proveedor, por lo que se siguieron las instrucciones de los protocolos que los acompañaban para resuspenderlos con agua Roux. Por último, se alicuotaron pequeñas fracciones de cada uno de ellos para alcanzar la concentración final (10µM) para su almacenamiento. Esto se efectuó teniendo en cuenta que los primers se utilizarían a lo largo de toda la duración del trabajo, y de esta manera se evita el estrés de someterlos a varios ciclos de congelado y descongelado.

El ADN genómico de micoplasma utilizado como control positivo fue adquirido mediante la empresa Vircell©. Se decidió utilizar ADN de micoplasma comercial debido al riesgo biológico que supone trabajar con un cultivo de este microorganismo vivo. El mismo incluía un buffer de resuspensión, el cual fue utilizado de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor para la reconstitución del mismo. La concentración de la solución final es de 19.000 copias/µl, de acuerdo a la especificación del proveedor (**Anexo F**).

Para todos los ensayos de PCR se utilizó un control negativo, cuya utilidad es demostrar que la reacción no arroja un resultado positivo cuando no se tiene ADN de micoplasma en la muestra, descartando la posibilidad de falsos positivos. Se decidió que la

muestra más representativa para tal fin sería utilizar el mismo medio de cultivo utilizado en los cultivos celulares, de forma que al mismo tiempo se compruebe la ausencia de micoplasma en dicho medio. El medio utilizado fue DMEM-F12, con 10% de suero fetal bobino (SFB) y suplementado con glutamina.

## 2.5. Preparación de master mix y protocolo de PCR

Para cada reacción de PCR se siguió un protocolo estricto para preparación de la mezcla de reacción, conocido como master mix. Ésta contiene todos los reactivos que se necesitan para la amplificación del material genético, excepto la muestra. Las master mix fueron preparadas en una cabina de flujo laminar horizontal de marca Bioamerican Science, modelo BS 297, situado en el cuarto de cultivo vegetal del L901, 9no piso de UADE Labs (**Fig. 10**). La misma fue cuidadosamente lavada y desinfectada con detergente y etanol al 70% previo a cada uso, minimizando así la posibilidad de contaminar la reacción. La colocación de las muestras en sus correspondientes tubos de PCR se realizó en la mesada adyacente al flujo laminar mencionado y utilizando un mechero para evitar contaminaciones. De esta manera se evitó ingresar material contaminado a la cabina de flujo laminar, permaneciendo ésta libre de micoplasma.



**Figura 10.** Cabina de flujo laminar utilizado en todo el desarrollo. A la izquierda, detalle de la Cabina de Flujo laminar. A la derecha, mesada de trabajo.

Los volúmenes necesarios de cada reactivo para realizar las master mix para uno y dos pares de primers fueron optimizados durante el desarrollo del kit (**Tabla I**). Las master mix fueron preparadas en tubos eppendorf estériles y luego alicuotadas en tubos de PCR de tapa “domo”, agregando luego la muestra correspondiente a cada reacción.

Reactivo (concentración stock)	Volumen (µl)	
	Primers para micoplasma	Primers para micoplasma y beta actina
H <sub>2</sub> O Roux	20,5	20
Buffer 10X	2,5	2,5
dNTPs 10mM	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75	0,75
Primer Forward 10µM	0,25	0,25
Primer reverse 10µM	0,25	0,25
Primer beta actina forward 10µM	-	0,25
Primer beta actina Reverse 10µM	-	0,25
Taq Polimerasa 5UI/µl	0,25	0,25
Volumen Final	25	25
Muestra*	1	1

**Tabla I:** Master Mix. Detalle cuantitativo de los reactivos utilizados para uno y dos pares de Primers. (\*) La muestra se coloca directamente en cada tubo de PCR, una vez alicuotada la master mix en los mismos.

Una vez preparadas los tubos de PCR con las master mix y las respectivas muestras, se colocaron en la termocicladora Mastercycler, marca Eppendorf (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Termocicladora Mastercycler. A la izquierda, ciclos programados en la termocicladora; a derecha, imagen frontal del equipo.

El protocolo de ciclos térmicos utilizado se muestra en la **Tabla II**, y fue utilizado a lo largo de todo el desarrollo realizado.

Cantidad de ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (Seg)
1	Desnaturalización inicial	95	300
35	Desnaturalización	94	60
	Hibridización	55	60
	Elongación	72	30
1	Elongación final	72	600

**Tabla II.** Programa de la termocicladora. Se muestran la cantidad de ciclos, tiempos y temperaturas de cada ciclo.

## 2.6. Preparación, siembra y revelado del gel de electroforesis

Para la preparación de los geles, se utilizó agarosa marca SIGMA (**Fig. 12**), y se la pesó utilizando la balanza OHAUS® marca Pioneer™ (**Fig. 12**). Todos los geles utilizados

fueron preparados al 1% en buffer TAE. Los volúmenes de siembra fueron en todos los casos 4µl de marcador molecular (**Anexo G**), con 1µl de buffer de carga, y 10µl de muestra, con 2µl de buffer de carga. El buffer de carga contiene bromofenol y xileno cianol como colorantes, junto con glicerol para conferirle peso a la siembra. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un equipo modelo Enduro, marca Labnet International (**Fig. 14**). Cada corrida se realizó a 120 Volts durante 40 minutos y entre 270mA y 280mA. El protocolo de preparación de geles fue el siguiente:

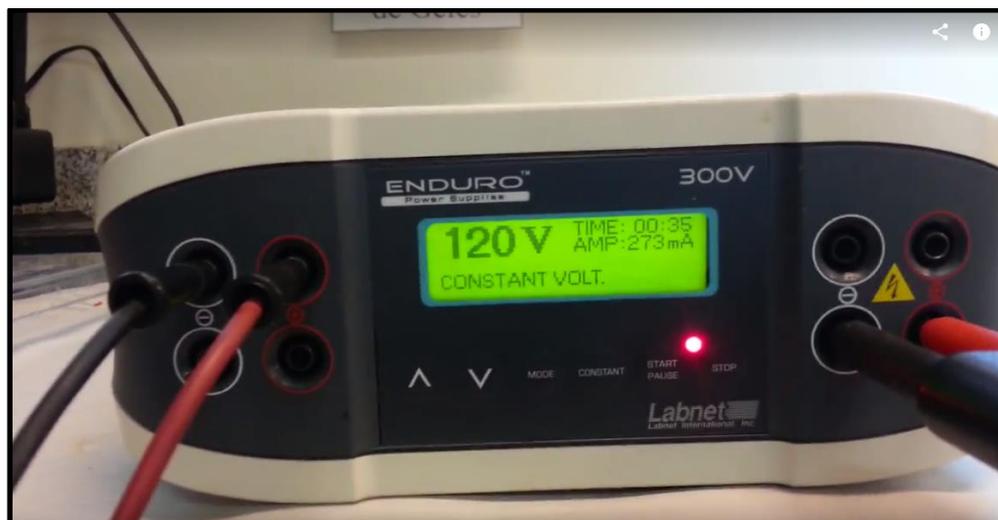
1. Pesar 1,2g de agarosa en un Erlenmeyer limpio y seco.
2. Medir 120ml en una probeta graduada y agregarlo al Erlenmeyer.
3. Colocar el recipiente en el microondas y encenderlo a máxima potencia 2,5 minutos.
4. Cumplido el tiempo agitar suavemente el Erlenmeyer y observar a trasluz la solución obtenida en búsqueda de trazas sólidas. En caso de encontrarlas, repetir los pasos 3 y 4 las veces que sea necesarias.
5. Enfriar el Erlenmeyer bajo una corriente de agua fría, agitando constantemente, hasta que cese el desprendimiento de vapor.
6. Colocar 6µl de Bromuro de Etidio con una micropipeta. Homogeneizar agitando cuidadosamente el Erlenmeyer.
7. Volcar el contenido en una cama de acrílico montada sobre su soporte. Eliminar las burbujas que pudieran haber quedado sobre la superficie del gel líquido con un tip de micropipeta, y colocar el peine en posición.
8. Esperar que el gel solidifique (aproximadamente 20 minutos).
9. Una vez sólido, retirar cuidadosamente el peine. Retirar la cama de acrílico junto con el gel del soporte, y colocarlo en la cuba de electroforesis.
10. Llenar el recipiente con buffer TAE hasta el nivel indicado, asegurando que el gel quede totalmente sumergido.
11. Sembrar cada muestra en la calle correspondiente, tomando nota del orden de siembra para futura referencia (**Fig. 13**).
12. Encender el equipo de electroforesis.



*Figura 12. Materiales utilizados para la preparación del Gel de Agarosa. Arriba, soporte, cama de acrílico y peine utilizados para el soporte físico del gel y la formación de calles. Abajo, balanza Pioneer y agarosa marca Sigma.*



*Figura 13. Proceso de siembra de un gel de agarosa.*



*Figura 14. Equipo de electroforesis en funcionamiento.*

Una vez finalizada la corrida de electroforesis se revelaron los resultados mediante irradiación con luz UV, tomando fotografías con una cámara Canon adaptada al dispositivo (Fig. 15).

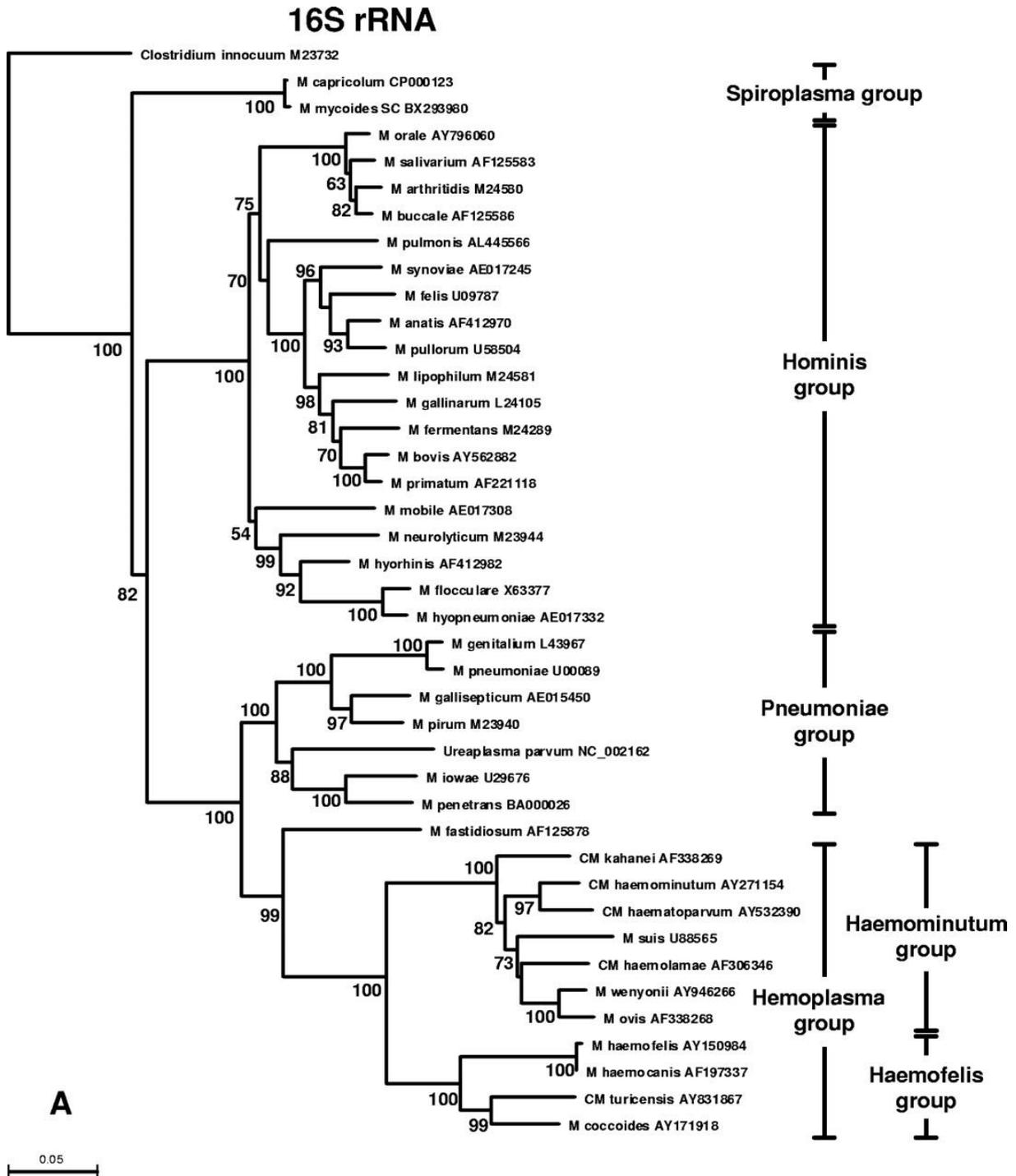


*Figura 15. Transiluminador. El mismo fue utilizado para la visualización de los geles de agarosa.*

### 3. Resultados

#### 3.1. Elección de secuencias para el diseño de primers

Por todo lo expuesto anteriormente, el primer paso para lograr nuestro objetivo fue determinar qué secuencia del ADN de micoplasma sería un buen candidato para amplificar por PCR. El mismo debería ser representativo para la mayor cantidad posible de especies de micoplasma, de modo que abarque un gran universo de contaminaciones de este género. A su vez, la secuencia debería ser lo más específica posible para la familia de micoplasma, para que al obtenerse una amplificación positiva se pueda asegurar con una gran confianza que se trata de este microorganismo, y no de cualquier otro. Esto supone que la secuencia no se encuentra en otros contaminantes comunes (como bacterias y hongos), ni tampoco en las células que se pretenden crecer en el cultivo celular. De entre todos los candidatos estudiados, los más prometedores resultaron ser las secuencias 16s rRNA y 23s rRNA, los cuales son componentes de la subunidades 30s y 50s del ribosoma procariota respectivamente. Se sabe que estas secuencias están muy conservadas dentro de cada familia de microorganismos (Liu W *et al*, 2012), lo que las convierte en un objetivo ideal para la identificación por PCR. La bibliografía consultada al respecto confirma esta afirmación (ver **Fig. 16**) y este hecho fue comprobado específicamente para el género micoplasma mediante alineación de secuencias con la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para este alineamiento hemos comparado las secuencias analizadas (16s y 23s) contra la base de datos completa de NCBI, utilizando un software gratuito ofrecido por esta base, llamado Blast (Madden T, 2002) por sus siglas en inglés “Basic Local Alignment Search Tool”. Los resultados corroboraron que las secuencias elegidas son altamente conservadas para este género, evidenciado por el gran número de especies de micoplasma que presentaron homología con las mismas. Las secuencias utilizadas en este alineamiento fueron las referencias NR\_074603.1 y L08897.1 para los fragmentos 16s y 23s respectivamente.



*Figura 16. Filogenia del gen 16s en micoplasma. Se muestran las distancias filogenéticas para distintas especies de micoplasma para el gen 16s, demostrando una alta conservación para dicho gen a lo largo de todo el género. Fuente: Iain R. Peters et. al., 2008.*

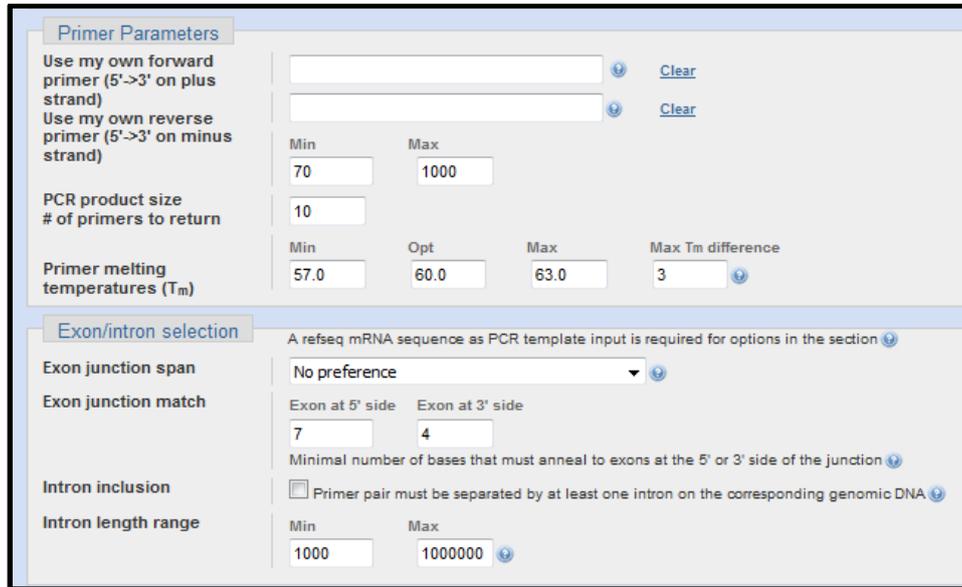
Durante el análisis del alineamiento además, prestamos especial atención a posibles homologías con el ADN humano, entendiendo que la causa más probable de contaminación durante la reacción de PCR proviene del técnico que la realiza. Si el mismo aportara involuntariamente cualquier tipo de célula (como células epiteliales, por ejemplo) y ésta contuviera regiones homólogas a las buscadas en micoplasma, se tendrían falsos positivos como resultado. Dado que el análisis de alineamiento comprobó que la homología entre las secuencias mencionadas y el genoma humano es muy remoto, se decidió que éstas serían las secuencias a amplificar durante la PCR.

Por otro lado, durante el planeamiento preliminar del kit de detección por PCR se gestó la idea de incluir un control interno dentro del mismo. Éste consiste en una amplificación adicional dentro del mismo tubo de PCR donde se incluye la muestra, la cual confirma que la reacción se llevó a cabo correctamente, depositando más confianza en el resultado. Esta amplificación adicional debe provenir de ADN de la célula del cultivo celular y estar siempre presente, más allá de la presencia o no de micoplasmas, y por tanto debe ser representativa al mayor número de líneas celulares posible. Se eligió para este control interno la secuencia altamente conservada que codifica para beta actina, una proteína que juega un rol crucial para el citoesqueleto celular. Esta proteína se encuentra presente en toda célula eucariota, por lo que resulta ideal para nuestro cometido. En este caso, la secuencia elegida para el diseño de los primers fue NG\_007992.1, la cual corresponde a la especie Humana. La decisión de elegir esta especie como referencia se tomó teniendo en cuenta que las líneas celulares que tendríamos disponibles más adelante durante los ensayos prácticos en UADE Labs son de origen humano. De todas formas, se comprobó mediante alineamiento con la herramienta Blast de NCBI que dicha secuencia fuera homóloga con líneas celulares muy variadas, a la vez que confirmamos la falta de homología el género micoplasma.

### **3.2. Diseño de primers**

Una vez elegidas las secuencias, se diseñaron los primers para poder obtener los amplicones, tanto de ADN de micoplasma como de beta actina. Para ello se utilizaron las herramientas informáticas Primer-BLAST (Ye J. *et al*, 2012) y Primer3Plus (Andreas Untergasser *et al*, 2007), creados especialmente para esta labor. Estos programas permiten parametrizar factores críticos, para que los primers diseñados cumplan con los requisitos

mencionados en el **Anexo A**, junto con cualquier especificación adicional que se necesite. Las **Fig. 17** y **18** muestran capturas de pantalla estos programas, para ejemplificar cómo se pueden diseñar los primers a medida, a partir de las secuencias elegidas en el punto anterior.



*Figura 17. Captura de pantalla del software Primer-Blast.*



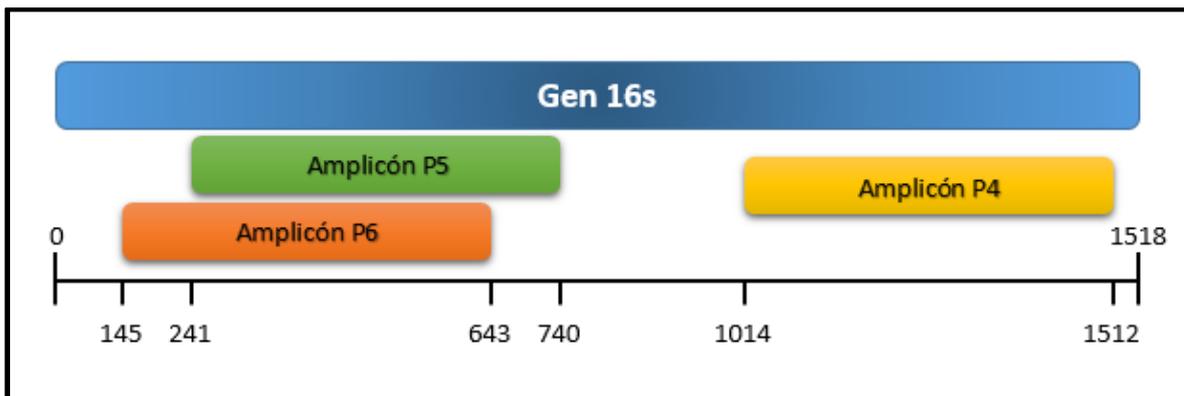
*Figura 18. Captura de pantalla del software Primer3Plus.*

Dado que ambos amplicones, el de la secuencia 16s de micoplasma y el de beta actina, se amplifican simultáneamente en la misma reacción, es necesario diferenciarlos de alguna manera. Para esto se diseñaron los primers de manera tal que los fragmentos amplificados tengan un tamaño considerablemente distinto. Esta diferencia se evidenciará luego al revelar el gel de electroforesis como dos bandas discretas separadas de acuerdo a su tamaño molecular. En el presente trabajo, se decidió que el amplicón correspondiente a micoplasma sería de 500pb, mientras que el amplicón de beta actina sería de 300pb. Éstos tamaños fueron elegidos teniendo en cuenta que el marcador molecular con el que contábamos para la electroforesis posee fragmentos de estos tamaños, simplificando así su identificación. Todos los primers diseñados durante el presente desarrollo se muestran en la **Tabla III**, resaltando aquellos que conforman la versión final del kit (ver el **Anexo H** para un detalle más extenso de dichos primers).

Nombre	Dirección	Secuencia de 5' a 3'	Longitud	TM (°C)
P1	Directo	CGTAGATGTCCGAATGGGGG	20	59,97
	Reverso	ACTTCAAACGCACGCCATC	20	60,04
P2	Directo	CATGTGGAGCGGTGAAATGC	20	60,18
	Reverso	TTGACGTCATCCCCACCTTC	20	59,68
P3	Directo	TCATCCTCGAGCTGAAGCAG	20	59,54
	Reverso	TTCTGGGTTTCGGAATGGGAC	20	59,67
P4	Directo	ATCGGAGTGACAGATGGTGC	20	59,82
	Reverso	GGTGATCCATCCCCACGTTC	20	60,46
P5	Directo	TTAGTTGGTGAGGTAATGGCCC	22	60,03
	Reverso	ATAGACCCAGTAAGCTGCCTTC	22	59,56
P6	Directo	AAACAATGGCTAATGCCGGATAC	23	59,68
	Reverso	GTTTGCTAGTATCCAAAGCGAGC	23	60,24
Act	Directo	ATGCTTCTAGGCGGACTATGAC	22	59,7
	Reverso	ATGGCAAGGGACTTCCTGTAAC	22	60,29
GAPDH M	Directo	TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG	22	61,47
	Reverso	AGTGATGGCATGGACTGTGGTC	22	62,59
GAPDH F	Directo	TCATTTCTGGTATGTGGCTGG	22	60,36
	Reverso	TCATTTCTGGTATGTGGCTGG	22	60,09

**Tabla III.** Secuencias de los primers diseñados. En verde se resaltan aquellos primers que conforman la versión final del kit.

La posición relativa de los amplicones que genera cada par de primers dentro de la secuencia buscada puede verse en la **Fig. 19**. En ésta hemos incluido únicamente los primers que conforman la versión terminada del desarrollo del kit. Los datos que dan origen a este esquema se encuentran en el **Anexo H**.



**Figura 19.** Esquema representativo de las posiciones relativas de los amplicones dentro del gen 16s. La escala se encuentra en pares de bases (pb).

Del mismo modo, los programas utilizados presentan los primers diseñados en el contexto de la secuencia utilizada como referencia, en formato FASTA. De aquí puede extraerse la secuencia exacta del amplicón que se espera obtener para cada par de primers, siendo ésta la secuencia comprendida entre los dos primers. (**Fig. 20, 21, 22 y 23**).

951	TACACGGAAA	ACCTTACCCA	CTCTTGACAT	CCTTCGCAA	GCTATAGAGA
1001	TATAGTGGAG	GTTATCGGAG	TGACAGATGG	TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC
1051	GTGTCGTGAG	ATGTTTGGTC	AAGTCCTGCA	ACGAGCGCAA	CCCCTATCTT
1101	TAGTTACTAA	CATTAAGTTG	AGGACTCTAG	AGATACTGCC	TGGGTAAGTG
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCTCTTA	CGAGTGGGGC
1201	CACACACGTG	CTACAATGGT	CGGTACAAAG	AGAAGCAATA	TGGCGACATG
1251	GAGCAAATCT	CAAAAAGCCG	ATCTCAGTTC	GGATTGGAGT	CTGCAATTCG
1301	ACTCCATGAA	GTCGGAATCG	CTAGTAATCG	CAGATCAGCT	ATGCTGCGGT
1351	GAATACGTTT	TCGGGTCTTG	TACACACCGC	CCGTCACACC	ATGGGAGCTG
1401	GTAATACCCA	AAGTCGGTTT	GCTAACCTCG	GAGGCGACCG	CCTAAGGTAG
1451	GACTGGTGAC	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAGAACGTGG
1501	GGATGGATCA	CCTCCTTT			

**Figura 20:** Secuencia del amplicón generado por el par de primers P4, sobre la secuencia del gen 16s. Los primers han sido resaltados. Fuente: Software Primer3Plus.

201	CTGTAAGGCG	CCACTAAAAG	ATGAGGGTGC	GGAACATTAG	TTAGTTGGTG
251	AGGTAATGGC	CCACCAAGAC	TATGATGTTT	AGCCGGGTCG	AGAGACTGAA
301	CGGCCACATT	GGGACTGAGA	TACGGCCCAA	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG
351	TAGGGAATAT	TCCACAATGA	GCGAAAGCTT	GATGGAGCGA	CACAGCGTGC
401	ACGATGAAGG	TCTTCGGATT	GTAAAGTGCT	GTTATAAGGG	AAGAACATTT
451	GCAATAGGAA	ATGATTGCAG	ACTGACGGTA	CCTTGTCAGA	AAGCGATGGC
501	TAACTATGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACA	TAGGTCGCAA	GCGTTATCCG
551	GAATTATTGG	GCGTAAAGCG	TTCGTAGGCT	GTTTGTTAAG	TCTGGAGTTA
601	AATCCCGGGG	CTCAACCCCG	GCTCGCTTTG	GATACTAGCA	AACTAGAGTT
651	AGATAGAGGT	AAGCGGAATT	CCATGTGAAG	CGGTGAAATG	CGTAGATATA
701	TGGAAGAACA	CCAAAGGCGA	AGGCAGCTTA	CTGGGTCTAT	ACTGACGCTG
751	AGGGACGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC

**Figura 21:** Secuencia del amplicón generado por el par de primers P5, sobre la secuencia del gen 16s. Los primers han sido resaltados. Fuente: Software Primer3Plus.

51	ATACATGCAT	GTCGAGCGAG	GTTAGCAATA	ACCTAGCGGC	GAATGGGTGA
101	GTAACACGTG	CTTAATCTAC	CTTTTAGATT	GGAATACCCA	TTGGAACAA
151	TGGCTAATGC	CGGATACGCA	TGGAACCGCA	TGGTTCCGTT	GTGAAAGGGC
201	CTGTAAGGCG	CCACTAAAAG	ATGAGGGTGC	GGAACATTAG	TTAGTTGGTG
251	AGGTAATGGC	CCACCAAGAC	TATGATGTTT	AGCCGGGTCG	AGAGACTGAA
301	CGGCCACATT	GGGACTGAGA	TACGGCCCAA	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG
351	TAGGGAATAT	TCCACAATGA	GCGAAAGCTT	GATGGAGCGA	CACAGCGTGC
401	ACGATGAAGG	TCTTCGGATT	GTAAAGTGCT	GTTATAAGGG	AAGAACATTT
451	GCAATAGGAA	ATGATTGCAG	ACTGACGGTA	CCTTGTCAGA	AAGCGATGGC
501	TAACTATGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACA	TAGGTCGCAA	GCGTTATCCG
551	GAATTATTGG	GCGTAAAGCG	TTCGTAGGCT	GTTTGTTAAG	TCTGGAGTTA
601	AATCCCGGGG	CTCAACCCCG	GCTCGCTTTG	GATACTAGCA	AACTAGAGTT
651	AGATAGAGGT	AAGCGGAATT	CCATGTGAAG	CGGTGAAATG	CGTAGATATA

**Figura 22:** Secuencia del amplicón generado por el par de primers P6, sobre la secuencia del gen 16s. Los primers han sido resaltados. Fuente: Software Primer3Plus.

7751	GCGGCTCCAT	CCTGGCCTCG	CTGTCCACCT	TCCAGCAGAT	GTGGATCAGC
7801	AAGCAGGAGT	ATGACGAGTC	CGGCCCTCC	ATCGTCCACC	GCAAATGCTT
7851	CTAGGCGGAC	TATGACTTAG	TTGCGTTACA	CCCTTTCTTG	ACAAAACCTA
7901	ACTTGCGCAG	AAAACAAGAT	GAGATTGGCA	TGGCTTTATT	TGTTTTTTTT
7951	GTTTTGTTTT	GGTTTTTTTT	TTTTTTTTTG	CTTGACTCAG	GATTTAAAAA
8001	CTGGAACGGT	GAAGGTGACA	GCAGTCGGTT	GGAGCGAGCA	TCCCCAAAG
8051	TTCACAATGT	GGCCGAGGAC	TTTGATTGCA	CATTGTTGTT	TTTTTAATAG
8101	TCATTCCAAA	TATGAGATGC	GTTGTTACAG	GAAGTCCCTT	GCCATCCTAA
8151	AAGCCACCCC	ACTTCTCTCT	AAGGAGAATG	GCCCAGTCCT	CTCCCAAGTC

**Figura 23:** Secuencia del amplicón generado por el par de primers Act, sobre la secuencia del gen beta actina. Los primers han sido resaltados. Fuente: Software Primer3Plus.

Tal como fuera mencionado en el **Anexo A**, uno de los puntos más relevantes en el diseño de los primers es su temperatura de *melting*. Dado que el par de primers que detecta el gen 16s en micoplasma y el par que detecta beta actina se encuentran en la misma reacción, resulta fundamental que todos los primers posean una temperatura de *melting* íntimamente relacionada. De no ser así, algunos primers tendrían una mejor hibridización que otros y, en consecuencia, los amplicones generados al término de la totalidad de los ciclos serían dispares respecto a su cantidad. También se debe tener en cuenta que estas pequeñas diferencias podrían provocar la unión de los primers con secuencias que no sean totalmente homólogas, fenómeno conocido como *mispriming*. La consecuencia directa es la aparición de amplicones inespecíficos, los cuales se observarían como bandas de tamaños inesperados en el gel de agarosa. Siendo este un desarrollo con fines diagnósticos, se debe evitar esto a toda costa para no cometer errores en la interpretación del resultado (Kousuke I. y Manabu F., 2001).

Para controlar estas condiciones se extremaron las medidas para constatar las diferencias entre las temperaturas de *melting* de todos los primers diseñados. Utilizando un software estadístico, el InfoStat (Di Rienzo J.A. *et al*, versión 2016), se analizaron las diferencias entre estas temperaturas calculando la media de todas las temperaturas, su desvío estándar y sus máximos y mínimos (**Fig. 24**).

Medidas resumen					
Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín Máx
Temperatura de Melting (°C..	18	60,19	0,75	1,25	59,54 62,59

**Figura 24.** Análisis de temperaturas de *melting* para todos los primers. Se utilizó el software *Infostat*.

Como puede verse, la máxima diferencia entre las temperaturas de *melting* de todos los primers es de 3°C, lo cual representa un buen resultado para éste parámetro en la etapa de diseño experimental.

Luego del testeo de la totalidad de los primers, que describiremos a continuación, se volvió a realizar el análisis únicamente con los primers que finalmente fueron seleccionados para incluir en la versión final del kit (**Fig. 25**). Este análisis demuestra que la diferencia entre las temperaturas de *melting* de los primers seleccionados disminuyó a menos de 1°C, lo cual

resulta coherente teniendo en cuenta que estas combinaciones de primers fueron las que resultaron más eficientes en la identificación por PCR propuesta.

Medidas resumen						
Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
Temperatura de Melting	8	59,97	0,33	0,55	59,56	60,46

*Figura 25. Análisis de las Temperaturas de melting para los primers que conforman la versión terminada del kit, utilizando Infostat.*

### 3.3. Ensayo con ADN genómico de micoplasma comercial

El primer interrogante con respecto a los primers diseñados era si realmente podían detectar la presencia de ADN de micoplasma en una muestra. Para esto se utilizó como muestra el ADN genómico de micoplasma patrón, asegurando así que los primers entrarían en contacto con este material genético. Para este ensayo no se utilizaron primers de beta actina, ya que las muestras no contenían material genético de células eucariontes.

La reacción de PCR se preparó siguiendo el protocolo mencionado en el apartado anterior, y se comenzó el programa en la termocicladora. Finalizada la misma, se sembró el material obtenido en un gel de agarosa preparado según el protocolo descripto, y se reveló el mismo en la cámara UV al finalizar la electroforesis. Tal como pudimos comprobar al efectuar este ensayo con la totalidad de los primers, no todos ellos pudieron amplificar el fragmento de 500pb correspondiente a cada uno. Para corroborar la efectividad de los primers que lograron una identificación positiva, se repitió el ensayo únicamente para estos pares de primers, utilizando en este caso diluciones seriadas del material genético de micoplasma (**Fig. 26 y 27**). Estos pares de primers, para los cuales comprobamos su correcto funcionamiento fueron denominados P4, P5 y P6.

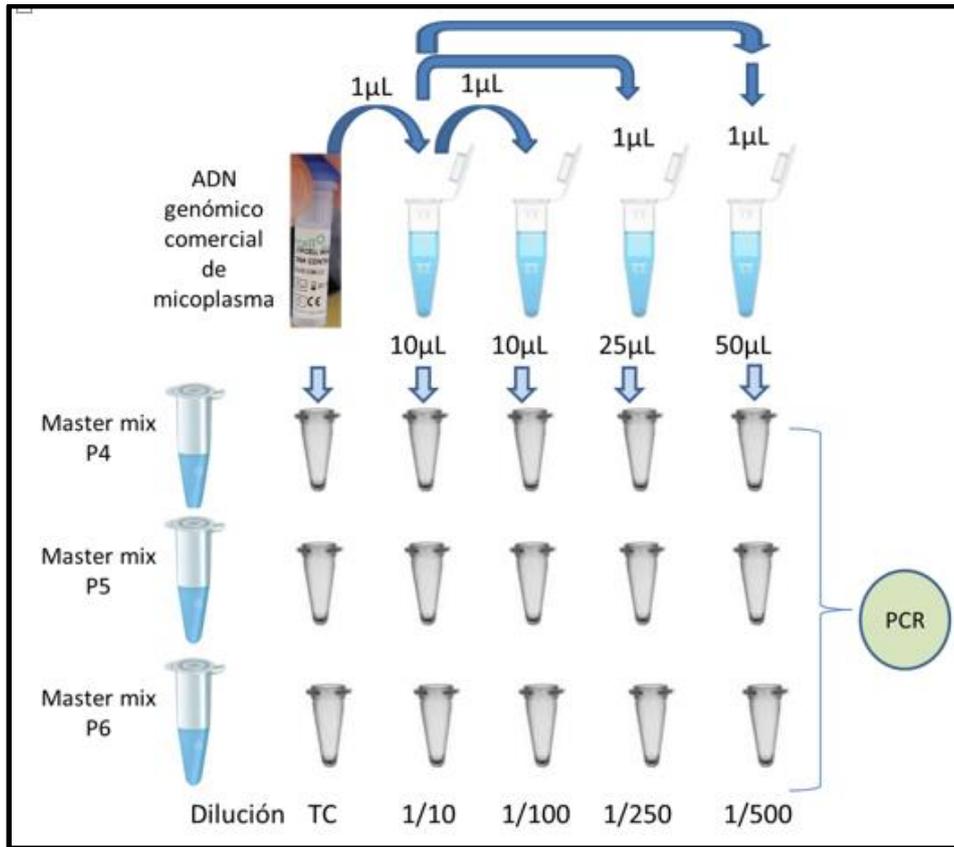


Figura 26. Esquema de trabajo para el ensayo con ADN comercial de micoplasma.

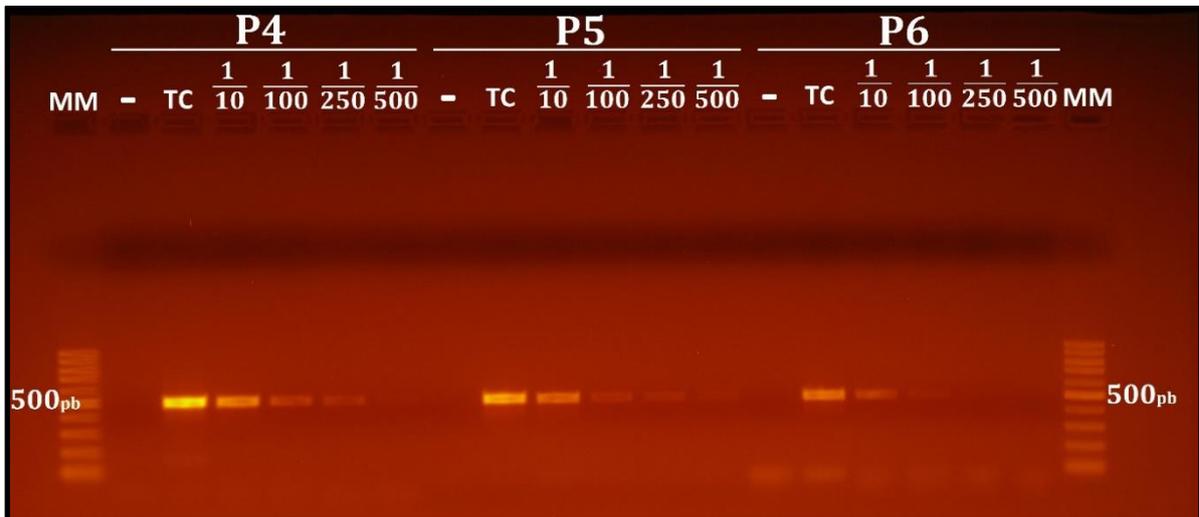


Figura 27. Amplificaciones positivas para los pares de primers P4, P5 y P6, a distintas concentraciones de ADN de micoplasma. Referencias MM: Marcador molecular 100pb / - : Control negativo / TC: Concentración "tal cual" / (1/10; 1/100; 1/250, 1/500): Factor de dilución de la muestra / (P4; P5; P6): Par de primers utilizados en la amplificación. Gel de Agarosa al 1%.

El gel muestra que los tres juegos de primers son eficientes en la identificación de micoplasma, al exhibir bandas de 500pb en todos los casos. La ausencia de bandas en los controles negativos sugiere que las bandas amplificadas provienen de la muestra utilizada, y no de los reactivos de la PCR. Por último, se pueden ver algunas trazas de amplificación sobre el final del frente de corrida, las cuales se muestran como bandas difusas de ADN. Estas bandas corresponden a dímeros de primers, los cuales no interfieren con la correcta interpretación del ensayo.

### 3.4. Límite de detección

Uno de los aspectos clave de la detección por PCR es la capacidad de detectar cantidades mínimas de micoplasma, y devolver un resultado positivo. Esta sensibilidad puede ser cuantificada al utilizar cantidades conocidas de ADN de micoplasma y estableciendo cuál es la mínima cantidad que el kit puede detectar. A esta concentración mínima se la conoce como límite de detección (LD) del método. Para este ensayo utilizamos los resultados obtenidos en la **Fig. 27**, para la cual se utilizaron distintas diluciones del ADN de micoplasma, partiendo desde una concentración conocida. Como puede verse en la imagen el par de primers P6 muestra bandas positivas hasta una dilución 1/250 de la solución de ADN de micoplasma comercial original, mientras que para los primers P4 y P5 la dilución 1/500 fue suficiente para evidenciar las bandas (aunque difusas). Dado que el primer de menor sensibilidad resultó ser el par de primers P6, éste delimita la menor concentración que podemos garantizar que el kit puede detectar. Para calcular dicha concentración, realizamos la siguiente operación:

$$\text{Concentración Inicial} \times \text{Factor de Dilución} = \text{Concentración Final}$$

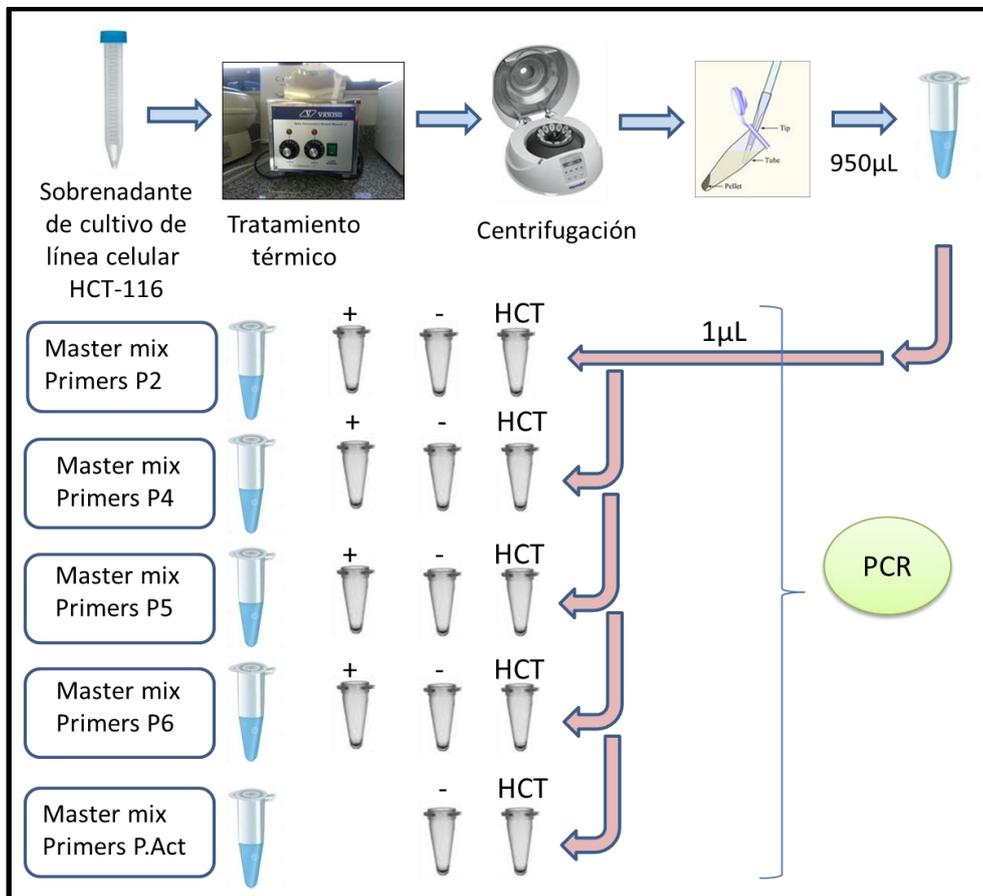
$$19.000 \text{ copias}/\mu\text{l} \times 1/250 = \mathbf{76 \text{ copias}/\mu\text{l}}$$

Este resultado significa que con un mínimo de 76 copias de ADN de micoplasma en la muestra de 1 $\mu$ l, el kit de detección desarrollado en el presente trabajo arrojará un resultado positivo. Como mencionamos anteriormente, si bien los otros dos juegos de primers resultan

ser mucho más sensibles (38copias/ $\mu$ l), decidimos informar el caso más pesimista de los tres como la concentración que el kit garantiza detectar en un cultivo celular.

### 3.5. Ensayo de detección con un cultivo celular contaminado

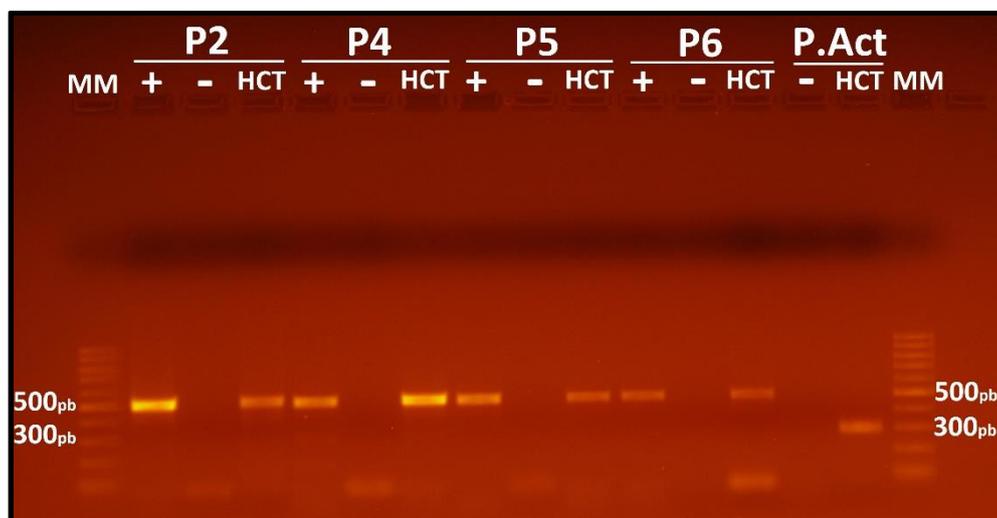
Una vez que comprobamos el funcionamiento de los juegos de primers para detectar ADN de micoplasma, procedimos a desafiarlos contra una muestra de cultivo celular eucarionte contaminado con micoplasma, junto con los primers diseñados para la secuencia de beta actina (**Fig. 28**).



**Figura 28.** Esquema de trabajo para ensayar la línea celular contaminada HCT-116.

El cultivo utilizado es de la línea celular HCT-116, y se diagnosticó contaminado con micoplasma al momento de la toma de muestra en el laboratorio de origen (Instituto Leloir) por tinción de Hoechst. La muestra fue obtenida retirando el sobrenadante de las placas, y almacenándolas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un tubo Falcon de 15ml estéril. Una vez recibida misma, ésta fue sometida al tratamiento térmico descrito en el apartado anterior. Por último, se sometieron

estas muestras al protocolo ya mencionado para PCR y revelado en un gel de agarosa (**Fig. 29**). En este ensayo se incluyó el juego de primers P2 que no forma parte de la presentación final del kit, sobre el cual se discutirá en el apartado de discusión.



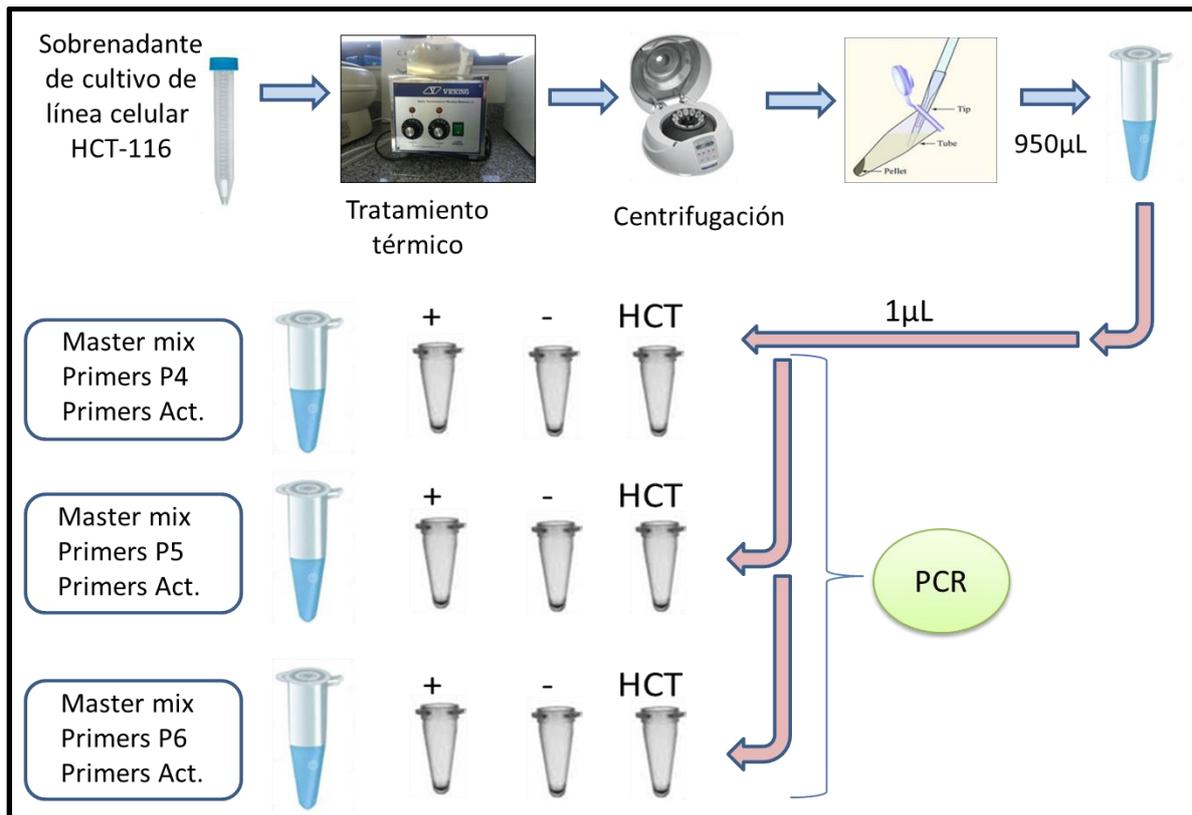
**Figura 29.** Amplificación positiva en línea celular contaminada. Referencias MM: Marcador molecular 100pb / + : Control positivo / - : Control negativo / HCT: Línea celular HCT-116 contaminada con micoplasma / (P2; P4; P6; Act): Par de primers utilizados en la amplificación. Gel de Agarosa al 1 %.

Como puede observarse en la figura, todos los pares de primers en estudio (P2, P4, P5 y P6) lograron amplificar correctamente fragmentos de ADN del tamaño esperado para micoplasma (500pb) a partir de esta muestra contaminada. Asimismo, se corroboró que el par de primers diseñados para beta actina también funcionaron, y pudieron amplificar fragmentos de 300pb de acuerdo a lo esperado a partir de la muestra procesada.

### 3.6. PCR múltiple en cultivo de línea celular contaminada

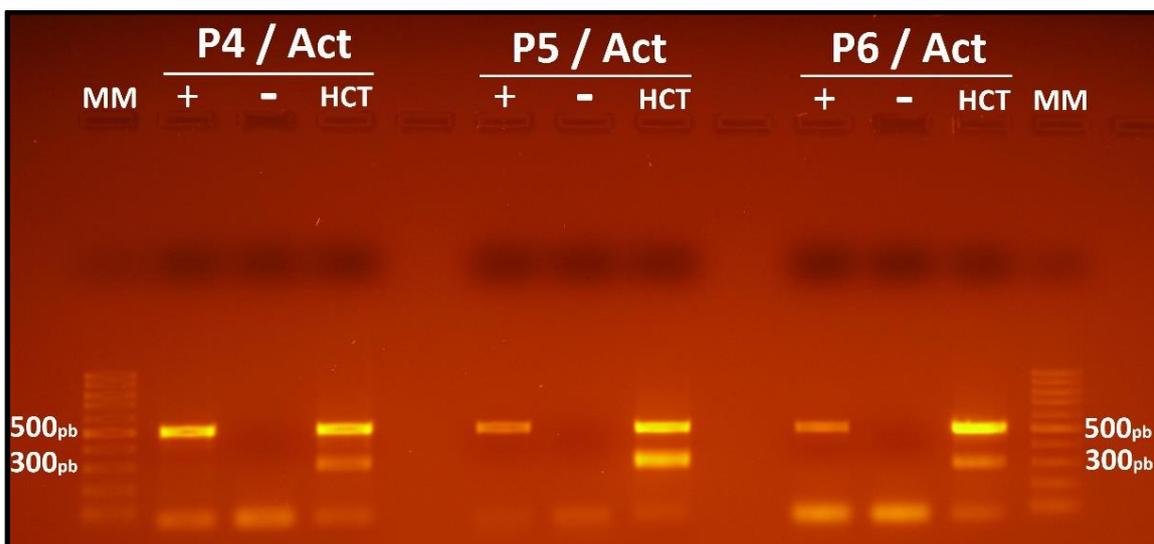
Habiendo comprobado el correcto funcionamiento de los primers, el siguiente paso en el desarrollo del presente trabajo consistió en lograr ambas reacciones de PCR en el mismo tubo (aquella que detecta ADN de micoplasma y aquella que detecta beta actina) con el fin de lograr la configuración deseada para el kit propuesto. A este procedimiento se lo conoce comúnmente como “multiplexado”, en el que dos o más amplificaciones se realizan simultáneamente en la misma reacción, cada una con su par de primers específicos. Para ello

se colocaron en la misma reacción los primers de beta actina junto con cada uno de los pares de primers para detectar micoplasma. De esta manera quedaron conformadas todas las reacciones con su control interno, amplificando ambos fragmentos de interés dentro de cada tubo de muestra (**Fig. 30**).



**Figura 30.** Esquema de trabajo para una PCR múltiple en una línea celular contaminada.

Para esta reacción se utilizó el protocolo para dos juegos de primers mencionado en el apartado anterior, y se sembraron los resultados en un gel de agarosa para revelarlos luego de la electroforesis (**Fig. 31**).



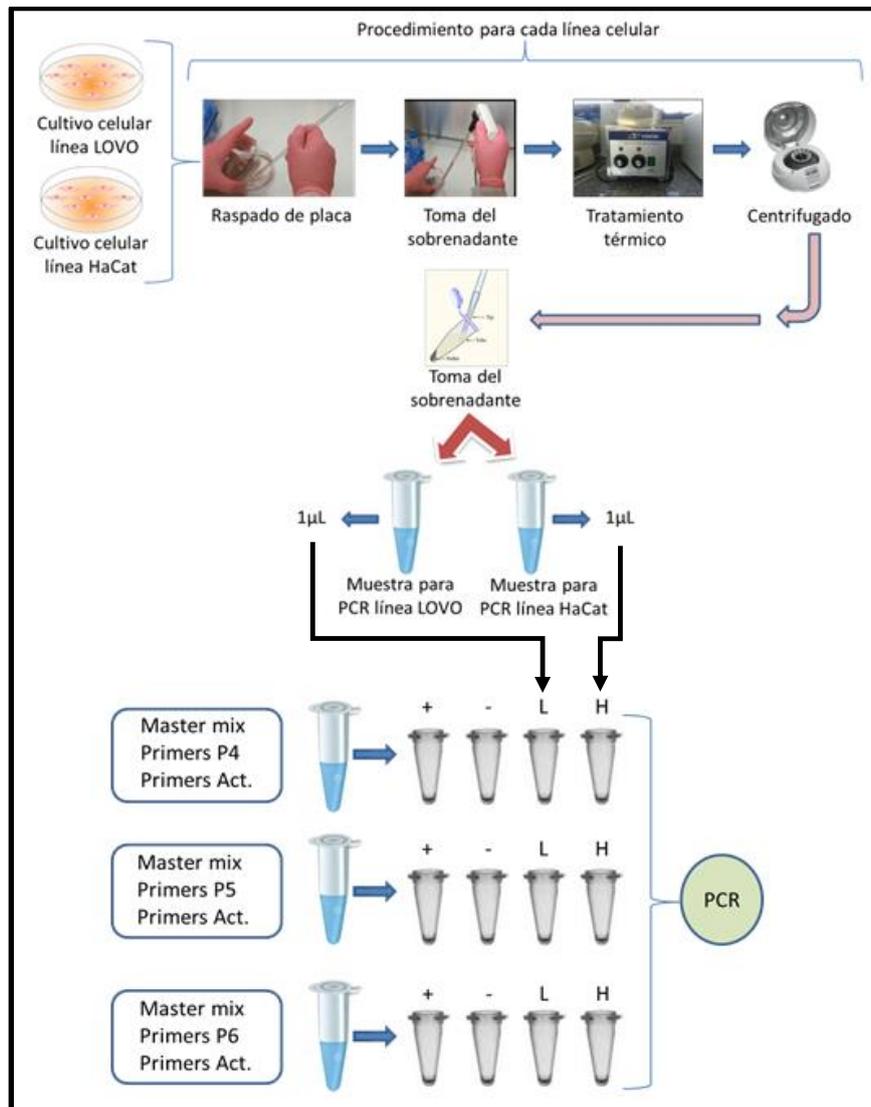
**Figura 31.** Amplificación positiva en una PCR múltiplex para una línea contaminada. Referencias MM: Marcador molecular 100pb / + : Control positivo / - : Control negativo / HCT: Línea celular HCT-116 contaminada con micoplasma / (P2; P4; P6; Act): Par de primers utilizados en la amplificación. Las calles 5 y 9 son calles vacías para simplificar el análisis. Gel de Agarosa al 1%.

El principal objetivo de este ensayo fue determinar si los dos pares de primers en cada reacción podían interferir entre ellos, sabiendo de antemano que ambos pares funcionan correctamente si son utilizados por separado. Como puede verse en la imagen en todos los casos se pudo identificar la presencia de micoplasma en las muestras, al mismo tiempo que el control interno confirma el correcto funcionamiento de la PCR al evidenciar la presencia de beta actina. Los controles negativos también confirman que la reacción sólo se produce cuando la muestra posee ADN, dado que resultan negativos para los tres juegos de primers. Por último, y al igual que antes, pueden evidenciarse dímeros de primers en todos los casos, que no interfieren con la correcta interpretación de los resultados.

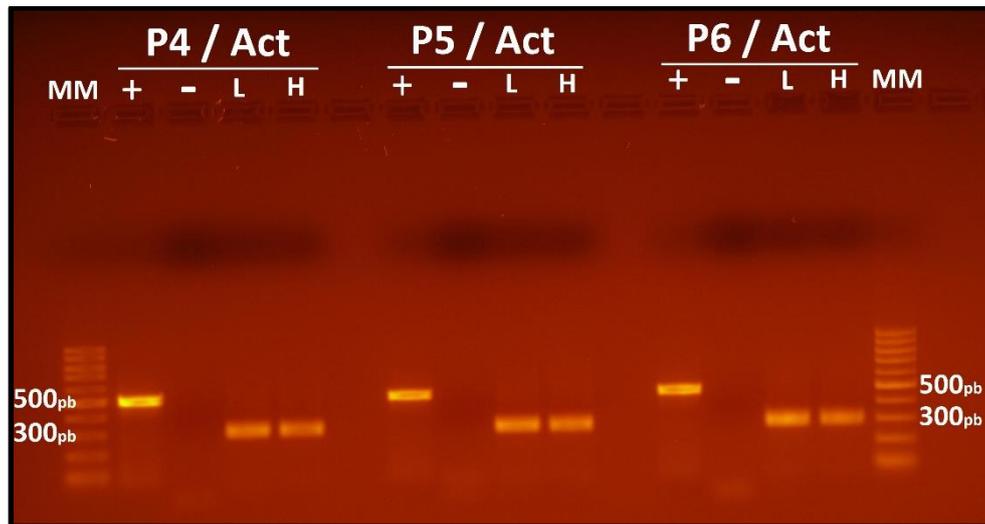
### 3.7. Ensayos de detección en cultivos celulares no contaminados

Una vez comprobado el correcto funcionamiento de la PCR múltiple, decidimos comprobar si el kit era capaz de distinguir muestras no contaminadas como tales, ya que hasta el momento sólo habíamos tenido disponibles muestras que contenían micoplasma.

Para este ensayo utilizamos líneas celulares libres de micoplasma, esperando que al desafiar el kit con ellas sólo se amplifiquen las bandas de 300pb características del control interno de beta actina (**Fig. 32**). Se utilizaron a tal fin las líneas celulares HaCat y LoVo crecidas en UADE Labs, descritas en el apartado anterior. Una vez alcanzado el 90% de confluencia se ejecutó el protocolo de toma de muestra detallado en **materiales y métodos**. Las muestras fueron congeladas 48hs a  $-20^{\circ}\text{C}$  para simular un caso real de laboratorio (habitualmente se acumulan las muestras para tener más de un cultivo para testear simultáneamente). Al momento de analizar las muestras, éstas se descongelaron y se sometieron al kit inmediatamente. La **Fig. 33** muestra los resultados obtenidos sobre un gel de agarosa.



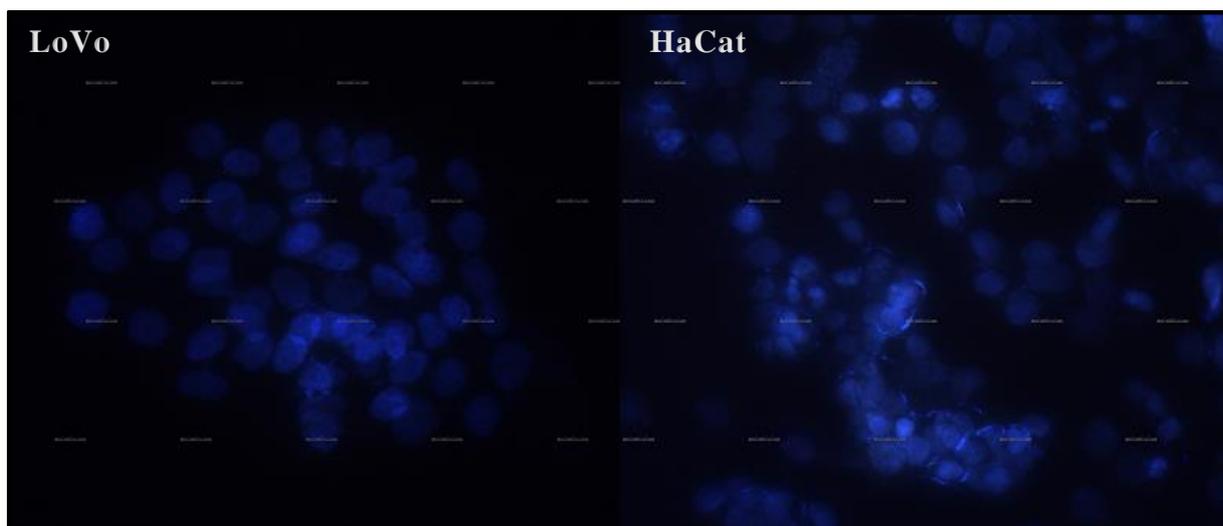
**Figura 32.** Esquema de trabajo para una PCR múltiple en una línea celular no contaminada.



**Figura 33.** Ausencia de micoplasma en líneas celulares no contaminadas. Referencias MM: Marcador molecular 100pb / + : Control positivo / - : Control negativo / L: Línea celular LoVo / H: Línea celular HaCat / (P2; P4; P6; Act): Par de primers utilizados. Las calles 6 y 11 son calles vacías para simplificar el análisis. Gel de Agarosa al 1%.

El gel revelado muestra que el kit es efectivo en la identificación de cultivos que no presentan una contaminación de micoplasma. Esto se pone de manifiesto al observar una única banda de ADN correspondiente a los amplicones de beta actina de 300pb del control interno del kit para cada muestra de las líneas celulares libres de contaminación (LoVo y HaCat). Los controles negativos validan el ensayo por la ausencia de bandas, mientras que los controles positivos demuestran que los primers funcionan correctamente en presencia de ADN de micoplasma.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron validados con una tinción de Hoechst sobre estos mismos cultivos celulares. La ausencia de coloración azul fuera de los núcleos celulares confirma la ausencia de micoplasma, convalidando así el resultado obtenido mediante el ensayo del kit desarrollado para estas líneas celulares (**Fig. 34**).



*Figura 34. Líneas LoVo y HaCat libres de micoplasma, verificado por Hoechst. A la izquierda, línea HaCat. A la derecha, línea LoVo. Aumento 400x.*

### 3.8. Cepas detectadas

Una vez definidos los primers que conformarían la versión final del kit, realizamos un análisis de éstos contra la base de datos NCBI con el objetivo de conocer la cantidad de cepas detectadas con este juego de primers. Sobre un total de 100 cepas de micoplasma analizadas, el 70% resultaron detectadas por, al menos, 1 juego de primers con un E-value significativo (E-value <0,05). De estas 70 cepas detectadas, 30 de ellas (42,9%) resultaron detectadas por un segundo par de primers y 5 (16,7%) fueron amplificadas por los tres juegos de primers simultáneamente, todas ellas con un E-value significativo (**Tabla IV**).

Otro dato que decidimos analizar fue la homogeneidad de los tamaños de los amplicones generados, dado que ésta parámetro resulta fundamental para la correcta interpretación de los resultados. El origen de los datos analizados surgen nuevamente del uso del software gratuito Blast, disponible en NCBI, y el análisis estadístico fue facilitado por el software Infostat. Para el par de primers P4, el tamaño del amplicón generado oscila entre 470 pb y 517 pb, para el par de primers P5, es entre 499 pb y 504 pb, y por último, para el par de primers P6, el tamaño mínimo de amplicon fue de 497 pb y el máximo tamaño fue de 501 pb (ver **Fig. 35**). Con estos resultados, resulta evidente que el resultado del gel de agarosa podrá ser interpretado correctamente, cualquiera sea la especie detectada.

MYCOPLASMA DETECTADO	P4		P5		P6		MYCOPLASMA DETECTADO	P4		P5		P6	
	Ev	AMP	Ev	AMP	Ev	AMP		Ev	AMP	Ev	AMP	Ev	AMP
M adleri		NG	S	503		NG	M iguanae	S	503	NS	500		NG
M agalactiae	S	491	S	503		NG	M indiense		NG	S	500	S	497
M agassizii		NG	NS	501		NG	M iners	S	490		NG		NG
M alkalescens	S	501	NS	500	S	500	M insons	NS	487		NG		NG
M alvi	NS	486		NG		NG	M iowae	NS	486		NG		NG
M alligatoris		NG	NS	502		NG	M lipofaciens		NG	S	503		NG
M anatis	S	486		NG		NG	M lipophilum		NG	S	502		NG
M anseris		NG	NS	500	NS	499	M maculosum	S	491		NG		NG
M arginini	S	501	NS	500	S	500	M meleagridis	S	491	S	500		NG
M arthritidis	S	501	S	500	S	499	M microti	NS	486		NG		NG
M auris		NG	NS	500	S	500	M mobile	NS	499		NG		NG
M bovigenitalium	S	491	S	503		NG	M molare	S	499		NG		NG
M bovirhinis	S	485		NG		NG	M mucosicanis	S	491	S	503		NG
M bovis	S	491	S	503		NG	M mustelae		NG	NS	502		NG
M bovoculi	S	499	S	501		NG	M mycoides	NS	499		NG	NS	501
M buccale		NG	S	500	S	497	M neophronis	S	501	NS	500	S	500
M californicum	S	491	S	503		NG	M neurolyticum	S	499		NG		NG
M canadense	S	501	NS	500	S	500	M opalescens	S	490	S	503		NG
M canis	S	485		NG		NG	M orale	S	501	S	500	S	497
M caviae		NG	S	503		NG	M ovipneumoniae	S	499		NG	NS	501
M citelli	S	486		NG		NG	M parvum	S	473		NG		NG
M cloacale		NG	S	500	NS	500	M penetrans	NS	486		NG		NG
M columbinasale		NG	S	503		NG	M phocicerebrale	S	501		NG	S	499
M collis	S	499		NG		NG	M phocidae	S	501	S	500	S	499
M columbinum	S	491	S	504		NG	M phocirhinis	S	491	S	503		NG
M columborale	S	486		NG		NG	M pneumoniae	NS	486		NG		NG
M conjunctivae	S	500	S	501		NG	M pullorum	S	486		NG		NG
M cricetuli	S	486		NG		NG	M pulmonis	S	501		NG	NS	498
M crocodyli	NS	486	NS	501		NG	M salivarium	S	501	S	501	S	501
M cynos	S	485		NG		NG	M simbae		NG	S	503		NG
M edwardii	S	485		NG		NG	M sp. CSL7518-lung	NS	491		NG		NG
M elephantis		NG	S	500		NG	M sp. Mirounga	NS	501	NS	500		NG
M equigenitalium		NG	S	500		NG	M sp. 'ovine/caprine serogroup 11'	NS	491	NS	503		NG
M equirhinis		NG	S	500	S	499	M sp. Phocoena	NS	501		NG		NG
M falconis		NG	NS	500	S	500	M sp. Sgv2a	NS	501		NG		NG
M faucium		NG	S	500	S	497	M sp. Sgv2b	NS	501		NG		NG
M felifaucium		NG	S	503		NG	M sp. Sgv2c	NS	501		NG		NG
M feliminutum		NG	S	499		NG	M sp. Sgv2d	NS	501		NG		NG
M fermentans	S	491	S	503		NG	M sp. Sgv2e	NS	501		NG		NG
M flocculare	NS	499		NG		NG	M spermatophilum		NG	S	503		NG
M gallinarum	S	491	S	503		NG	M sphenisci	S	490		NG		NG
M gallopavonis	S	486		NG		NG	M spumans	S	501	NS	500	S	500
M gateae		NG	NS	500	S	499	M subdolum		NG	NS	500	S	497
M genitalium	NS	488		NG		NG	M synoviae	S	485		NG		NG
M haemocanis	NS	470		NG		NG	M testudinum	S	499		NG	S	499
M haemofelis	NS	470		NG		NG	M timone		NG	NS	500	NS	497
M hominis	S	499	S	500	S	499	M verecundum	S	486	S	502		NG
M hyopneumoniae	NS	499		NG		NG	M vulturii	S	517		NG		NG
M hyorhinis	S	499	NS	501		NG	M zalophi	NS	501	NS	500		NG
M hyosynoviae		NG	S	500	S	497	M zalophidermidis	NS	491		NG		NG

**Tabla IV:** Especies de micoplasma potencialmente detectadas por el kit.

Referencias: P4, P5, P6 = Juego de primers analizado. Ev = E-value; AMP = amplicón generado (en pb); NG = no genera; S = significativo (E-value <0,05); NS = no significativo.

Medidas resumen					
Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
P4	74	493,27	8,22	470,00	517,00
P5	56	501,21	1,41	499,00	504,00
P6	27	498,96	1,37	497,00	501,00

*Figura 35: Valores estadísticos para los tamaños de amplicón generados por cada juego de primers. Datos generados con el programa Infostat (Di Rienzo J.A. et al, versión 2016).*

## 4. Discusión

Durante el desarrollo del trabajo han surgido nuevas ideas que modificaban levemente el curso del desarrollo, a la vez que enfrentamos algunas dificultades que dieron lugar a la discusión en cuanto a cuál sería el mejor camino para sortearlas. Todas las decisiones tomadas se hicieron teniendo en cuenta cual era el objetivo principal del trabajo, intentando siempre mejorar el concepto original con cada paso. Presentamos aquí algunas de estas discusiones, los distintos planteos que se tuvieron en cuenta para la resolución de los mismos, y las resoluciones que dieron forma a la propuesta final del kit.

### 4.1. Límite de detección

Al analizar la sensibilidad del kit desarrollado, nos propusimos comparar los resultados obtenidos con los kits comerciales actualmente disponibles en el mercado que utilizan la PCR como base para el diagnóstico de micoplasma. Al consultar las fichas técnicas de dichos kits, hemos encontrado que no todos informan la cantidad mínima de micoplasma que logran detectar con su producto. Aquellos que si lo hacen, expresan sus resultados en cantidad de copias de ADN de micoplasma por cada  $\mu\text{l}$  de muestra, lo cual nos permite comparar directamente nuestros resultados, calculados en la misma unidad. Estos valores oscilan entre 24 copias/ $\mu\text{l}$  (Norgen Biotek Corp.) y 5 copias/ $\mu\text{l}$  (Genlantis). Comparando estos valores con nuestro resultado (76 copias/ $\mu\text{l}$ ), y teniendo en cuenta que los kits mencionados provienen de empresas altamente especializadas en desarrollos de este tipo, interpretamos que hemos podido desarrollar un kit de alta calidad, con resultados competitivos (al menos en el ámbito académico), pudiendo mejorarse éstos aún más al profundizar el desarrollo. Mencionaremos más adelante algunos puntos de mejora que hemos ideado, los cuales incrementarían sensiblemente la calidad del kit desarrollado.

### 4.2. Aparición de contaminaciones

El kit diseñado durante el presente trabajo tiene como principal intención la detección de un contaminante muy específico: el ADN genómico de micoplasma. Si bien las características propias de este microorganismo lo diferencian en gran medida de otros procariotas, no debe olvidarse que también existen grandes similitudes. Estas similitudes son

las que trajeron a nuestra mesa de trabajo un contratiempo irónico: la aparición de contaminaciones (principalmente bacterianas) en nuestro kit de detección de contaminación. Dada la cercanía filogenética existente entre micoplasma y otros procariontes, es posible que los primers diseñados encuentren cierta homología en éstos últimos. Cualquiera de los reactivos de PCR utilizados puede ser susceptible a una contaminación bacteriana que, aunque sea incipiente, se amplificará luego durante los ciclos programados hasta revelarse en una banda discreta en el gel de electroforesis. Incluso los materiales descartables y herramientas comunes de laboratorio son susceptibles a estas contaminaciones, si no son manipuladas cuidadosamente.

En nuestro caso, la contaminación encontrada se reveló como una banda difusa de aproximadamente 450pb, la cual se distinguía incluso en los controles negativos, evidenciando que el problema no provenía de las muestras de cultivo. Para eliminarla, extremamos los cuidados en cuanto al cuidado de material descartable y micropipetas, a la vez que renovamos la totalidad de los reactivos de PCR. Por otro lado, también modificamos la ubicación en donde realizábamos la reacción ya que en un principio utilizamos una cabina de flujo laminar horizontal dedicado a manipulación de bacterias. Al encontrarnos con esta contaminación, y al suponer que la fuente era bacteriana, decidimos utilizar una cabina dedicada a la manipulación de semillas, tomando la precaución adicional de no ingresar muestras (contaminadas o no) a este flujo. Con las medidas tomadas finalmente pudimos retomar el curso normal del trabajo, aunque se evidenció la necesidad de un flujo laminar dedicado a la preparación de las master mix de las PCR, junto con reactivos y materiales descartables libres de posibles contaminantes.

### 4.3. PCR Multiplexada

Durante el desarrollo del trabajo siempre se tuvo en cuenta que el kit sería utilizado por técnicos de laboratorio, por lo que se buscó optimizar en la medida de lo posible el tiempo que este ensayo requiere. Uno de los proyectos que se propusieron a tal fin fue el de incluir todos los pares de primers funcionales dentro de una misma reacción de PCR, incluyendo el control interno de beta actina. Esto era teóricamente posible dado que durante el diseño de los primers se buscó que todos tengan la misma temperatura de *melting*, y los tamaños de los fragmentos amplificados fuera siempre igual para micoplasma (500pb). Si cualquiera de los

pares de primers encontraba su secuencia homóloga, se vería una amplificación característica en el gel de agarosa, la cual indicaría una contaminación por micoplasma. Si bien es cierto que en dicho caso sería imposible determinar cuál de los primers fue el que amplificó, en realidad no es estrictamente necesario para determinar si una muestra está contaminada o no.

Las pruebas efectuadas con este objetivo en mente no fueron satisfactorias, encontrando amplificaciones espurias y ausencia de banda de micoplasma para el control positivo, lo que nos indica la interacción indeseada entre los distintos pares de primers que interfirieron finalmente con la reacción de PCR.

#### **4.4. Cantidad de primers a incluir en el kit**

Como se mencionó anteriormente, al momento de diseñar los primers del kit se postularon varios candidatos, que luego fueron analizados por separado para verificar su correcto funcionamiento. De todos los primers analizados, finalmente 3 de ellos fueron elegidos para versión final del kit. Esta cantidad de primers, sin embargo, fue decidida como fruto de un minucioso análisis. Por un lado, si bien incluir un único primer sería en teoría suficiente para identificar ADN de micoplasma en una muestra, la capacidad de identificar especies variadas de este microorganismo se ve sesgada por el primer en particular elegido. Pequeñas variaciones en el extremo 5' o 3' de la secuencia amplificada podrían ser suficientes para generar falsos negativos, lo que resultaría muy perjudicial para el análisis. Por otra parte, cada par de primers adicional que se agrega al análisis resulta en tres tubos adicionales de reacción, teniendo en cuenta que para cada uno de ellos se debe incluir un control positivo, un control negativo y la muestra en cuestión.

Para tomar la decisión nos valimos del análisis estadístico realizado y presentado anteriormente (**sección 3.8** del siguiente trabajo), en el cual demostramos que esta combinación podría detectar 70 especies distintas de micoplasma, de un total de 100 especies descritas en dicha base de datos. Estos resultados muestran que la elección de los primers ofrecen un adecuado balance entre sensibilidad del kit frente a micoplasma, en contraste con la cantidad de tiempo y reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo. En nuestro análisis, concluimos que incluir tres pares de primers al kit le provee la robustez suficiente al método, y al mismo tiempo requiere una cantidad de trabajo amena para cualquier laboratorista.

## 4.5. Toma de muestras

Durante la propuesta de tesis se postuló que el kit terminado incluiría un vial con un buffer de lisis, el cual sería utilizado para destruir las células del cultivo celular y de micoplasma, liberando así el ADN al medio extracelular. Este proyecto se gestó al consultar bibliografía de kits similares, para los cuales estaba indicado dicho buffer como parte del protocolo.

Durante el desarrollo del presente trabajo dicho buffer fue preparado para ser utilizado en las muestras de cultivos celulares, sin embargo al avanzar sobre el desarrollo del mismo fue evidente que el buffer de lisis no era necesario para obtener la cantidad de ADN suficiente en la muestra. Más aún, en nuestra opinión este reactivo adicional no solo no sería necesario, sino que probablemente interfiera con el correcto desarrollo de la reacción. Nuestro fundamento para esta hipótesis radica en lo sensible que resulta una reacción específica de PCR en cuanto a la concentración de cada uno de los reactivos. El agregado de sales y detergentes (reactivos habituales de los buffers de lisis consultados en la bibliografía) sería sin duda un desafío para lograr una PCR exitosa, lo cual podría incluso precisar pasos adicionales de tratamiento de la muestra para neutralizarlos, previo a la reacción de PCR.

El protocolo de toma de muestras que se describió durante el desarrollo fue puesto a punto a partir de varios protocolos de detección de micoplasma, ajustando las condiciones a aquellas que fueron más favorables durante los ensayos realizados.

## 4.6. Primers descartados

El diseño *in silico* de primers no está exento de errores, y las pruebas experimentales que demuestren los resultados previstos es inevitable. De hecho, durante el diseño de primers del presente trabajo se formuló la idea de buscar dos regiones distintas del ADN de micoplasma: una sería complementaria a fragmentos del gen 16s, y otra al gen 23s, las cuales son dos regiones altamente conservadas de este microorganismo. Luego del diseño, se obtuvieron los primers y se comprobó la efectividad de todos ellos. Como era de esperarse, no todos los primers funcionaron, y de este ensayo se seleccionaron los que mejor lo hicieron. En este análisis inicial solo uno de los pares de primers para la secuencia 23s fue satisfactorio al cual denominamos P2, aunque luego decidimos descartarlo por presentar menor sensibilidad

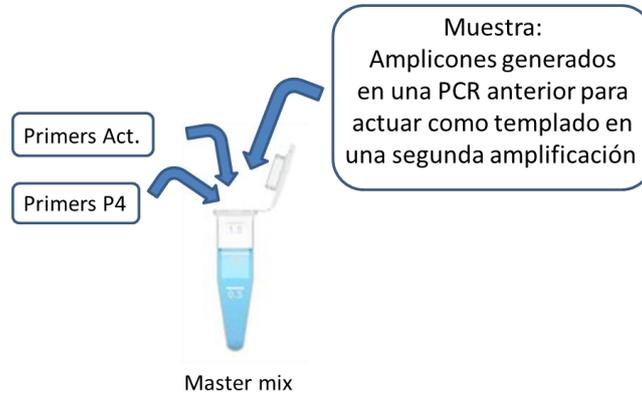
que el resto. Adicionalmente, este par de primers descartado sufrió una contaminación durante el desarrollo del trabajo, posiblemente con algún microorganismo procariota, lo cual se evidenciaba como una banda de aproximadamente 450pb en los geles de agarosa. Esta contaminación nos trajo muchos contratiempos, como ya mencionamos anteriormente en la discusión del presente trabajo. Lamentablemente, y aun tomando las precauciones necesarias, la contaminación persistió para este par de primers en particular. Esta situación, junto con la menor sensibilidad frente al ADN purificado de micoplasma, nos hizo tomar la decisión de no incluir a este par de primers en el kit.

Al concebir la idea de incluir un control interno dentro del kit, se incluyó una segunda secuencia (además de beta actina) altamente conservada en las células Eucariotas. Se trata de la secuencia que codifica para GAPDH (Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa), de las cuales se seleccionaron dos a partir de la base de datos de NCBI, las referencias NG\_007073.2 y NM\_002046.5. Se diseñaron dos pares de primers siguiendo directivas análogas que las utilizadas en el caso de beta actina, y los mismos fueron desafiados a las líneas celulares mencionadas en el trabajo. Sin embargo, ninguna de ellas logró ser amplificada por estos juegos de primers. Al ser el objetivo de estos primers únicamente la detección de secuencias dentro del ADN de las células del cultivo, y habiendo obtenido un resultado positivo con los primers de beta actina, se decidió rápidamente descartar estos primers no funcionales para seguir adelante con el desarrollo.

#### **4.7. Marcador molecular propio**

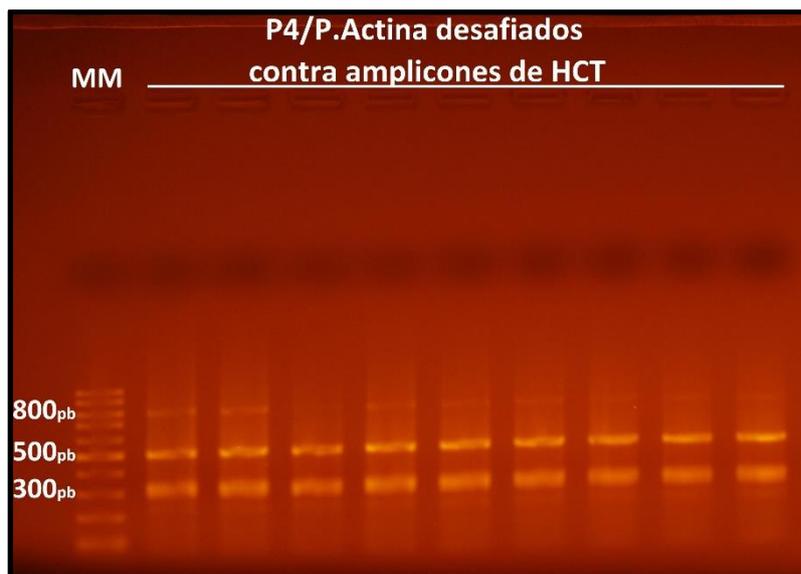
Otro concepto que manejamos durante la concepción de este kit fue la de minimizar los costos del mismo, logrando a la vez la mayor funcionalidad posible. Esto nos llevó a idear un reemplazo para el marcador de peso molecular, el cual debe incluirse en cualquier gel de electroforesis convencional. Dado que este marcador cumple la única función de indicar la distancia recorrida por fragmentos de ADN de dimensiones conocidas, propusimos crear un marcador de peso molecular que únicamente contuviera los dos fragmentos de interés para el kit: el amplicón de micoplasma (500pb) y el amplicón de beta actina (300pb). Esto haría más práctico el uso del marcador, evitando confusiones en cuanto al tamaño que debieran tener las bandas en un resultado. Para minimizar el costo, además, sugerimos que esto podría ser

logrado con amplificaciones sucesivas de los productos de PCR que contuvieran dichos amplicones (**Fig. 36**).



**Figura 36.** Esquema de trabajo para una segunda amplificación por PCR.

Si bien en teoría este concepto es posible, también es sabido que frecuentemente la reacción de PCR genera fragmentos indeseados que no se evidencian en el gel de agarosa por no poseer suficiente cantidad de material genético. El problema surge al amplificar nuevamente estas muestras, ya que estos fragmentos también serán multiplicados y posiblemente generen bandas discretas durante el revelado de la segunda electroforesis. Tal es el caso para el ensayo realizado, donde pueden verse bandas de fragmentos indeseados (**Fig. 37**).



**Figura 37.** Marcador molecular de producción propia. Referencias MM: Marcador molecular 100pb. Se observa una banda indeseada de aproximadamente 800pb. Gel de agarosa al 1%.

## 4.8. Tratamiento de las muestras

El control interno que hemos incluido en el kit, el cual amplifica regiones codificantes para beta actina, también impulsó cambios durante el desarrollo del trabajo. Si bien demostramos que los primers logran amplificar la región deseada de dicho gen, el protocolo de toma de muestras sufrió varias modificaciones a lo largo del trabajo hasta lograr su forma final. En un principio, y basados en bibliografía de kits similares de origen extranjero, se postuló que las muestras debían tomarse del sobrenadante de un cultivo celular creciendo en monocapa, sin más recaudos. Cuando se siguió este protocolo para la toma de muestras iniciales, se observó que la cantidad de ADN de las células del cultivo resultaba insuficiente para lograr una amplificación. Esto nos resultó coherente con el hecho que las células se encontraban sanas en el cultivo, sin perturbaciones que las levantara de su anclaje, ni las lisara, liberando su material genético en el proceso. Para lograr una mayor concentración de ADN en la muestra, propusimos que la confluencia del cultivo debía ser elevado (entre el 80% y el 100% al momento de tomar la muestra), y debe rasparse con una pipeta vacía el fondo de la superficie que sostiene a las células (normalmente, el fondo de la placa). Con esto se asegura un desprendimiento celular lo suficientemente alto como para que los primers del control interno logren amplificar el fragmento de beta actina buscado, y se cumpla con la función de control interno.

## 4.9. Presentación final del kit

Una vez finalizado el desarrollo del kit, ideamos cuál sería la presentación final del mismo. Para esto nos propusimos darle un nombre y un logo. El nombre elegido para el kit fue “KDM” ya que se trata de un **kit para detección de micoplasma**. Para el logo elegimos incluir el logotipo de UADE en agradecimiento a todo lo que la universidad nos ha brindado a través de nuestros años de estudio. Asimismo, puede verse la bandera argentina en alusión a que nuestro proyecto constituye el primer desarrollo de un kit de estas características desarrollado por estudiantes en el país (**Fig. 38**).



*Figura 38. Logotipo del kit desarrollado.*

La presentación final del kit incluiría todos los elementos específicos para el ensayo, los cuales incluyen un total de 9 viales:

- 6 viales para los pares de primers P4, P5 y P6 (para detectar micoplasma).
- 2 viales para el par de primers Act (control interno).
- 1 vial conteniendo ADN genómico de *M. hominis* (control positivo).

El resto de los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR son de uso común en cualquier laboratorio de ensayos biológicos, por lo que no estarían incluidos en el kit.

Por último, y teniendo en cuenta que éste bien podría ser un kit de detección de uso comercial, comenzamos a idear un packaging que fuera funcional al uso del mismo. Para esto, utilizamos nuestra experiencia durante el desarrollo del trabajo, con los aciertos y dificultades que encontramos durante el mismo. Con estos conceptos en mente, surgieron los siguientes puntos claves que el envase podría cumplir:

- **Almacenamiento vertical de los tubos.** Si bien esto parece trivial, encontramos que acomodar los tubos de forma vertical en un freezer de un laboratorio utilizado por muchas personas no siempre es sencillo. Si la posición de los tubos es incorrecta cuando se los coloca en el freezer de almacenamiento, el contenido de los mismos se congelará sobre la tapa de los mismos, lo que probablemente lleve a pérdidas del material al abrirlo.

- **Sostén físico de los tubos.** Por otro lado, también vimos la necesidad de utilizar racks de tubos que sostengan los eppendorfs para preparar la master mix durante el ensayo. Para un laboratorio de cualquier índole sería muy poco usual tener racks de uso exclusivo para cada ensayo en particular, siendo los mismos utilizados a demanda indistintamente. Dadas las características de la familia de micoplasma, podría asumirse que un rack que no ha sido debidamente descontaminado podría contener trazas de éste microorganismo, las cuales podrían contaminar a su vez la reacción de PCR, devolviendo un falso positivo. Esta característica nos hizo pensar que el empaque del kit podría ser utilizado como un rack de eppendorfs, eliminando así la posibilidad de contaminación por utilizar materiales no dedicados. El mismo debería tener orificios suficientes para los tubos incluidos en el kit, además de algunos lugares vacíos para contener los tubos que se utilizarán para realizar la master mix, y los tubos de PCR.
  
- **Empaque congelante.** Siguiendo con el concepto de mantener refrigerados todos los reactivos durante la preparación de la master mix, y teniendo en cuenta que los mismos se almacenarán siempre en el mismo envase, se desprendió la idea de que el mismo sea de un material que conserve el frío una vez que se saque del freezer de almacenamiento. De esta forma, los reactivos se conservarán a una temperatura ideal, y al colocar los tubos de la reacción en los orificios del envase también éstos se mantendrán a una baja temperatura, reuniendo así los requisitos recomendados.

#### 4.10. Mejoras a futuro

Si bien el kit desarrollado en el presente trabajo no tiene objetivos de comercialización, hemos planteado cuáles serían los requisitos que éste debería cumplir para llevarse a cabo. Presentamos a continuación un resumen de dichos requisitos.

##### ★ Mayor universo de muestras

Para lograr el objetivo del desarrollo del kit de detección fue necesario testear muestras contaminadas y no contaminadas, para corroborar si el resultado que se obtenía era el predicho en cada caso. Si bien el objetivo fue satisfactorio para todas las muestras para el objetivo del presente trabajo, la diversidad de las líneas celulares testeadas debería ser más

amplio para poder garantizar a potenciales clientes la repetitividad de éstos resultados sobre un universo de cultivos celulares mucho más amplio. Por ejemplo, el testeo realizado en el trabajo se realizó exclusivamente sobre líneas celulares de origen humano (HCT-116, LoVo y HaCat). Para un desarrollo comercial sería conveniente realizar pruebas sobre líneas celulares de distintos organismos, priorizando aquellos más utilizados en los ámbitos de aplicación industrial y académico. Lo que se busca lograr en todos los casos es que el control interno del kit logre identificar la beta actina presente en la línea celular testeada, y a la vez que las condiciones del medio de cultivo no inhiban la reacción de PCR.

#### ★ Control de calidad del kit

Los resultados que hemos obtenido fueron validados mediante tinciones con reactivo de Hoechst, tanto para la línea contaminada como para las líneas libres de micoplasma. Sin embargo, para conferirle más robustez al kit desarrollado es necesario contrastar los resultados obtenidos con métodos más específicos en la detección de micoplasma. Una posibilidad sería adquirir kits comerciales disponibles actualmente, cuyos resultados ya han sido necesariamente validados y demostrados para lograr su comercialización. Si los resultados resultan idénticos sobre la misma muestra utilizando el kit desarrollado y un kit comercial, esto validaría el correcto funcionamiento de nuestro desarrollo.

#### ★ Tres amplificaciones en el mismo tubo

Como se indicó anteriormente en esta sección, uno de los proyectos que llevamos a cabo durante el presente trabajo fue el desarrollo de una PCR múltiple de un solo tubo, el cual contuviera todos los primers en la misma reacción. Esta alternativa es mucho más atractiva a nivel comercial, ya que ofrece un análisis mucho más sencillo, obteniendo la misma información al final del ensayo. Representaría un cambio en la presentación del kit, ya que se incluiría un único tubo de primers, y a la vez el usuario del kit sólo prepararía un juego de PCR de tres tubos: Control negativo, control positivo y tubo de muestra. Además, tener menor cantidad de tubos de reactivos de los cuales pipetear ofrece otras ventajas al kit, como la minimización del error introducido por pipeteo (en cuanto a volumen y a la posibilidad de equivocación de qué reactivo pipetear) y menor probabilidad de contaminación de los reactivos. A la vez, se simplificaría la electroforesis ya que el esquema de siembra se modificaría de las nueve calles actuales a sólo tres.

Si bien el ensayo que diseñamos a tal fin fue negativo (ver **Fig. 39**), el mismo podría repetirse con algunas consideraciones. Por ejemplo, podrían utilizarse solo dos pares de primers para micoplasma en la reacción, lo que podría evitar la interferencia en la reacción que observamos en nuestro desarrollo experimental, y la ausencia de amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, esto traería como consecuencia la pérdida de representatividad de una porción del ADN de micoplasma, por lo que sería una discusión entre las facciones técnicas y de marketing del desarrollo del kit: una puja entre la pérdida de sensibilidad versus la comodidad para el usuario.



**Figura 39.** Amplificaciones inespecíficas al multiplexar los tres juegos de primers. Referencias MM: Marcador molecular 100pb / Primer Mix: Primers P4, P5, P6 y Act multiplexados en la misma reacción. Se observa una nítida banda inespecífica de aproximadamente 180pb. Gel de agarosa al 1%

#### ★ Validación de los amplicones

El método de PCR tiene una gran base teórica que apoya su utilización para el diagnóstico de cultivos celulares. Sin embargo, al pensar en la comercialización del kit que hemos desarrollado es inevitable pensar en garantizar a los clientes el correcto funcionamiento del mismo. En tal sentido, llegado el caso sería necesario identificar por medios más precisos que el ADN amplificado durante la PCR pertenece a micoplasma, lo cual

podría lograrse secuenciando dichas amplificaciones. Existen varias compañías que llevan a cabo dicha labor, aunque dado el alcance del presente trabajo y el costo que esto conlleva se optó por no llevarlo a cabo.

Por otro lado, también sería necesario aislar células de micoplasma de cultivos contaminados y cultivarlas. De esta manera se las podría caracterizar de modo tal de identificar cuáles son las especies de este microorganismo que el kit logra identificar. Cabe destacar que mediante el análisis de alineamiento realizado durante el diseño de los primers, hemos generado un listado de especies que poseen alta homología con al menos uno de los tres primers que incluye el kit. Sin embargo, y como ya hemos demostrado a lo largo del trabajo, las bases teóricas deben ser verificadas empíricamente para comprobar esta afirmación. Lógicamente, cuanto más variadas sean las especies de micoplasma identificadas, más confianza se le dará al kit para detectarlas durante su uso en cultivos celulares.

#### ★ **Master mix ya preparada**

Al idear el kit desarrollado como un producto comercial, surgió la idea de hacerlo lo más simple posible para su utilización. Todos los protocolos de PCR recomiendan que las reacciones de PCR deben ser introducidas en la termocicladora lo más rápido posible, minimizando el tiempo entre la siembra de la muestra en el tubo y el inicio del primer ciclo. Esta recomendación tiene un fundamento teórico, y es que una vez que se tienen todos los reactivos necesarios los primers comienzan a interactuar con el templado presente en la muestra y con los otros primers, incluso a bajas temperaturas. Cuanto más tiempo transcurra entre este punto y el inicio de la PCR, más tiempo disponible tienen los primers para hibridizar con regiones que no sean perfectamente complementarias, o bien con otros primers (como se discutió anteriormente), formando unas primeras amplificaciones no deseadas. Dadas las características de la PCR, estos primeros fragmentos serían amplificados exponencialmente una vez iniciado el protocolo de la termocicladora, lo que daría resultados confusos en el revelado de la electroforesis.

Este concepto nos hizo pensar en la idea de una master mix ya preparada, a la cual solo reste agregarle la muestra al momento de utilizarla, y con eso dar inicio inmediatamente a la PCR. Por lo expuesto anteriormente, también postulamos que la Polimerasa no debería estar incluida en esta master mix, de modo tal que no se corra el riesgo de amplificar dímeros de primer durante su almacenamiento. Otra alternativa para salvar este inconveniente sería

agregar una Polimerasa de las denominadas “Hot-Start”, las cuales poseen la característica única de activarse únicamente cuando alcanzan una temperatura inicial muy alta, cercana a la del primer ciclo de la PCR. Con esto, se asegura que la polimerización no comience hasta que la reacción no se encuentre en la termocicladora.

Este proyecto de una master mix ya preparada no fue desarrollado experimentalmente durante el desarrollo del presente trabajo, teniendo en cuenta que la mayor dificultad que presentaba el mismo era la estabilidad a lo largo del tiempo. No podríamos asegurar, sin testearlo previamente, que ninguno de los reactivos en la master mix no sufra alguna modificación que interfiera con su correcto funcionamiento durante el período que se encuentre congelada aguardando su uso. Este período de tiempo, una vez corroborado, sería el que estableciera la fecha de vencimiento del kit, si éste llegar a utilizarse con esta metodología.

En resumen, concluimos que el desarrollo del kit planteado desde un principio ha sido exitoso, y esperamos que el resultado obtenido sea provechoso para el diagnóstico de líneas celulares en UADE Labs, quedando abierta la posibilidad de mejorar aún más su rendimiento y su versatilidad para aplicarlo en otros ámbitos.

## 5. Conclusión

- El análisis de las secuencias de micoplasma resultó exitoso, encontrando múltiples primers candidatos para amplificar por PCR.
- De todos los primers obtenidos, tres pares de primers lograron identificar la secuencia correspondiente a micoplasma. Asimismo, un par de primers logró identificar la secuencia de beta actina en la muestra, para ser utilizado como control interno.
- Se logró estandarizar la toma de muestras a partir de una puesta a punto exitosa, trabajando con cultivos celulares. Los parámetros críticos de la PCR fueron evaluados y optimizados para los primers diseñados, obteniendo bandas nítidas en todos los casos.
- Hemos redactado un manual de usuario con detalles del funcionamiento del kit, con un protocolo de uso e interpretación de los resultados. Con ayuda del mismo, el kit puede ser utilizado para diagnosticar cultivos celulares en unas pocas horas en cualquier laboratorio (**Anexo B**).

## 6. Bibliografía

Allard, A. *et al.*, 1990. “Polymerase Chain Reaction for Detection of Adenoviruses in Stool Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 28.12 (1990): 2659–2667.

Andreas Untergasser, Harm Nijveen, Xiangyu Rao, Ton Bisseling, René Geurts, and Jack A.M. Leunissen, 2007. “Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research”. *Nucleic Acids Res.* 2007 35: W71-W74.

APPLIED BIOLOGICAL MATERIALS INC. GENLANTIS [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<https://www.abmgood.com/>>

Armstrong S.E. *et al.*, 2010. “The scope of Mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry.” *Biologicals*. 38(2):211-3.

ATCC [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<https://www.atcc.org/>>

BI - Biological Industries [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.bioind.com/>>

Biotechs B&M Labs. [en línea]. [consulta 10 set. 2016].

<<https://biotechspain.com/es/index.cfm>>

Bleve, Gianluca *et al.*, 2003. “Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products.” *Applied and Environmental Microbiology* 69.7 (2003): 4116–4122. PMC. Web. 8 Sept. 2016.

Burtscher, Carola *et al.*, 1999. “Detection of Salmonella Spp. and Listeria Monocytogenes in Suspended Organic Waste by Nucleic Acid Extraction and PCR.” *Applied and Environmental Microbiology* 65.5 (1999): 2235–2237.

Cassol, S *et al.*, 1991. “Use of Dried Blood Spot Specimens in the Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by the Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 29.4 (1991): 667–671.

CELLSAFE [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.cells-safe.com/>>

Clayton, C. L. *et al.*, 1992. “Sensitive Detection of Helicobacter Pylori by Using Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 30.1 (1992): 192–200.

Di Rienzo J.A. *et al.*, 2016. InfoStat versión 2016 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <<http://www.infostat.com.ar>>

Drexler H.G., y Uphoff CC, 2002. “Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention.” *Cytotechnology* 2002 Jul; 39(2):75-90.

Erb, R. W., yand I Wagner-Döbler., I., 1993. “Detection of Polychlorinated Biphenyl Degradation Genes in Polluted Sediments by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction.” *Applied and Environmental Microbiology* 59.12 (1993): 4065–4073.

Fuhrman, Jed A., Xiaolin Liang, and Rachel T. Noble, 2005. “Rapid Detection of Enteroviruses in Small Volumes of Natural Waters by Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR.” *Applied and Environmental Microbiology* 71.8 (2005): 4523–4530.

Genecopoeia Inc. [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.genecopoeia.com/>>

GENLANTIS [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.genlantis.com/>>

Gómez, Duarte, Oscar G., Jing Bai, and Elizabeth Newel, 2009. “Detection of E. Coli, Salmonella Spp., Shigella Spp., Yersinia Enterocolitica, Vibrio Cholerae, and Campylobacter Spp. Enteropathogens by Three-Reaction Multiplex PCR.” *Diagnostic microbiology and infectious disease* 63.1 (2009): 1–9.

Hagen, R. M. *et al.*, 2002. “Strategies for PCR Based Detection of Burkholderia Pseudomallei DNA in Paraffin Wax Embedded Tissues.” *Molecular Pathology* 55.6 (2002): 398–400.

Hierro, Núria *et al.*, 2006. “Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine.” *Applied and Environmental Microbiology* 72.11 (2006): 7148–7155.

Hwang, Jeong-Min., *et al*, 2012. “A Multi-Laboratory Profile of Mycoplasma contamination in Lawsonia Intracellularis cultures.” *BMC Research Notes* 5 (2012): 78.

Innoprot [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.innoprot.com/>>

INTRON BIOTECHNOLOGY [en línea]. [consulta 10 set. 2016].  
 <<http://www.intronbio.com/Intro.asp>>

Jeng, Kevin *et al.*, 2012. “Comparative Analysis of Two Broad-Range PCR Assays for Pathogen Detection in Positive-Blood-Culture Bottles: PCR–High-Resolution Melting Analysis versus PCR-Mass Spectrometry.” *Journal of Clinical Microbiology* 50.10 (2012): 3287–3292.

Khan, A. A., yand Cerniglia, C. E Cerniglia, 1994. “Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* from Clinical and Environmental Samples by Amplification of the Exotoxin A Gene Using PCR.” *Applied and Environmental Microbiology* 60.10 (1994): 3739–3745.

Khan, J.A. *et al.*, 2013. “In Vitro Detection of Pathogenic *Listeria Monocytogenes* from Food Sources by Conventional, Molecular and Cell Culture Method.” *Brazilian Journal of Microbiology* 44.3 (2013): 751–758.

Kim, Sangburn, Ronald G. Labbe, and Sangryeol Ryu, 2000. “Inhibitory Effects of Collagen on the PCR for Detection of *Clostridium Perfringens*.” *Applied and Environmental Microbiology* 66.3 (2000): 1213–1215.

Kong, Fanrong *et al.*, 2001. “Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture.” *Applied and Environmental Microbiology* 67.7 (2001): 3195–3200.

Kopchick J., Sackmann-Sala L. y Juan Ding, 2007. “Primer: molecular tools used for the understanding of endocrinology.” *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* (2007) 3, 355-368.

Kousuke I., y Manabu F. (2001). “Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR.” *Appl. Environ. Microbiol.* August 2001 vol. 67 no. 83753-3755.

Kox, L. F. *et al.*, 1995. “PCR Assay Based on DNA Coding for 16S rRNA for Detection and Identification of *Mycobacteria* in Clinical Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 33.12 (1995): 3225–3233.

Kuske, Cheryl R. *et al.*, 1998. “Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil.” *Applied and Environmental Microbiology* 64.7 (1998): 2463–2472.

Laberge, I. *et al.*, 1996. “Detection of *Cryptosporidium Parvum* in Raw Milk by PCR and Oligonucleotide Probe Hybridization.” *Applied and Environmental Microbiology* 62.9 (1996): 3259–3264.

Lampel, K. A., Jagow, J. A., Trucksess, M., & Hill, W. E., 1990. “Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food.” *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1536–1540.

Liu W., Fang L, Li M, *et al.*, 2012. “Comparative Genomics of *Mycoplasma*: Analysis of Conserved Essential Genes and Diversity of the Pan-Genome.” Fairhead C, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35698.

Lo, Terry M., Christine K. Ward, and Thomas J. Inzana, 1998. “Detection and Identification of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* Serotype 5 by Multiplex PCR.” *Journal of Clinical Microbiology* 36.6 (1998): 1704–1710.

Madden T, 2002. “The BLAST Sequence Analysis Tool.” *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Chapter 16.

Molla Kazemiha, Vahid *et al.*, 2009. “PCR-Based Detection and Eradication of Mycoplasmal Infections from Various Mammalian Cell Lines: A Local Experience.” *Cytotechnology* 61.3 (2009): 117–124.

Nakao, H. y, and Popovic, T Popovic, 1997. “Development of a Direct PCR Assay for Detection of the Diphtheria Toxin Gene.” *Journal of Clinical Microbiology* 35.7 (1997): 1651–1655.

Nikfarjam L., y Farzaneh P., 2012. “Prevention and Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Culture.” *Cell Journal (Yakhteh)*. 2012;13(4):203-212.

Norgen Biotec Corp [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<https://norgenbiotek.com/>>

Oliwa-Stasiak, Kamila, Olga Kolaj-Robin, and Catherine C. Adley, 2016. "Development of Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of *Bacillus Cereus* Group Species: Differentiation of *B. Weihenstephanensis* and Rhizoid *B. Pseudomycooides* Isolates from Milk." *Applied and Environmental Microbiology* 77.1 (2011): 80–88.

Peeters, Charlotte, Stijn Daenekindt, and Peter Vandamme, 2016. "PCR Detection of *Burkholderia Multivorans* in Water and Soil Samples." *BMC Microbiology* 16 (2016): 184.

Peters I. R., *et al.*, 2008. "RNase P RNA Gene (*rnpB*) Phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species." *Journal of clinical microbiology*, 2008, p. 1873–1877.

Petra Boukamp *et al.*, 1988. "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." (1988). *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771.

Pettersson B. *et al.*, 2000. "Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg *et al.* 1989) based on 16S rDNA sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 291–301.

Promokine [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.promokine.com/>>

Purohit, Hemant J., Atya Kapley, and Purushottam Khanna, 1997. "Detection of Enteropathogens by PCR." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 12.Suppl 1 (1997): 111–114.

Randall K., *et al.*, (1985). "Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia." *Science*, 230, 1350-1354.

Rottem S. y, Barile M.F., 1993. "Beware of Mycoplasmas." *Trends Biotechnol.* 1993 Apr; 11(4):143-51.

Ruggirello, Marianna *et al.*, 2014. Paola Dolci, and Luca Cocolin. "Detection and Viability of *Lactococcus Lactis* throughout Cheese Ripening." Ed. Benoit Foligne. *PLoS ONE* 9.12 (2014): e114280.

Sigma-Aldrich CO. [en línea]. [consulta 10 set. 2016]. <<http://www.sigmaaldrich.com/>>

- Skakni, L. *et al.*, 1992. “Detection of Mycoplasma Pneumoniae in Clinical Samples from Pediatric Patients by Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 30.10 (1992): 2638–2643.
- Steffan, R. J., & Atlas, R. M. (1988), “DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples”. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(9), 2185–2191.
- Steiger, Y. *et al.*, 1992. “Rapid and Biologically Safe Diagnosis of African Swine Fever Virus Infection by Using Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 30.1 (1992): 1–8.
- Van Engelenburg, F. A. *et al.*, 1993. “Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen.” *Journal of Clinical Microbiology* 31.12 (1993): 3129–3135.
- Weisburg W. G. *et al.*, 1989, “A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification”, *Journal of bacteriology*, 1989, p. 6455-6467.
- Wolf, Sandro *et al.*, 2007. “Sensitive Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for the Detection of Human and Animal Noroviruses in Clinical and Environmental Samples” *Applied and Environmental Microbiology* 73.17 (2007): 5464–5470.
- Yavlovich A., Tarshis M. y Rottem S., 2004. “Internalization and intracellular survival of Mycoplasma pneumoniae by non-phagocytic cells.” *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Apr 15; 233(2): 241–246.
- Ye J. *et al.*, 2012. Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). “Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.” *BMC Bioinformatics.* 13:134.
- Zeng, Qing-Yin *et al.*, 2004. “Detection and Quantification of Wallemia Sebi in Aerosols by Real-Time PCR, Conventional PCR, and Cultivation.” *Applied and Environmental Microbiology* 70.12 (2004): 7295–7302.

Zheng, Hao Qiang *et al.*, 2011. “Detection of Murine Leukemia Virus or Mouse DNA in Commercial RT-PCR Reagents and Human DNAs.” Ed. Bradley S. Schneider. PLoS ONE 6.12 (2011): e29050.

## **ANEXOS**

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cualquier reacción de PCR consta de 4 pasos básicos, denominados *melting*, *annealing*, Elongación y Terminación. El proceso completo es llevado a cabo por un equipo especializado, llamado termocicladora, la cual incrementa y disminuye la temperatura según sea necesario a intervalos de tiempo preestablecidos. Este equipo normalmente permite almacenar distintos programas de PCR, lo cual le indica al mismo qué temperatura debe alcanzar en cada paso, por cuánto tiempo debe mantenerla, y cuántas veces debe repetir los pasos en forma cíclica. Si bien las temperaturas y duraciones de cada paso de una PCR deben ponerse a punto para cada diseño de experimento en particular, existen reglas generales que aplican a todos los casos, y estas condiciones tienen relación directa con la función que cumple cada una de las etapas en la PCR. A continuación, describiremos brevemente las características de cada paso para un protocolo de PCR estándar.

- ***Melting***

El primer paso consiste en desnaturalizar las moléculas de doble hélice de ADN provenientes de la muestra, de modo tal que queden expuestos los residuos nucleotídicos de ambas cadenas. Esto se logra con un aumento de temperatura (normalmente a 95°C), la cual entrega suficiente energía a las moléculas de ADN para romper los enlaces de puente hidrógeno que une las dos hebras, aunque dejando inalterada la estructura primaria de cada cadena. En el primer ciclo de una PCR este paso suele extenderse (normalmente 5 minutos) para asegurar que todo el material genético sea desnaturalizado. Adicionalmente, la alta temperatura de este paso logra inactivar la acción de nucleasas que puedan estar presentes en la muestra, y que potencialmente pueden destruir el material genético.

- ***Annealing***

En el segundo paso, se disminuye la temperatura de la reacción para que las hebras de ADN ya separadas hibridicen con pequeños fragmentos de ADN, conocidos como Cebadores o Primers. Estos fragmentos son diseñados específicamente para cada PCR, de modo tal que resulten complementarios con los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN que se quiere amplificar. De este paso se desprende la necesidad de conocer, al

menos, el inicio y el final de la secuencia que se quiere amplificar. En este paso la temperatura dependerá del diseño específico del Primer, aunque suele encontrarse en el orden de los 55°C a 60°C.

- **Elongación**

Posteriormente, la temperatura vuelve a elevarse para llevar a cabo el tercer paso de la PCR. Este paso remeda la polimerización de ADN que todas las células realizan durante su ciclo de vida en la que una enzima, la Polimerasa, cataliza la unión entre nucleótidos. Esta enzima toma como punto de partida el Primer hibridizado con la cadena de ADN simple, y completa la cadena complementaria siguiendo como molde la hebra de templado. Dado que la polimerasa no puede iniciar la polimerización si no tiene una pequeña fracción de ADN de doble cadena, el método es selectivo para muestras que contengan material genético complementario a los Primers utilizados. Si éstos no encuentran su par homólogo dentro del ADN de la muestra, no hay hibridización y por ende no hay polimerización. Este principio es el que se aprovecha para utilizar a la PCR como método de detección, como veremos más adelante. La temperatura alcanzada durante este paso normalmente es de 72°C, ya que es la temperatura óptima para el correcto funcionamiento de la taq polimerasa, como describiremos más adelante en detalle.

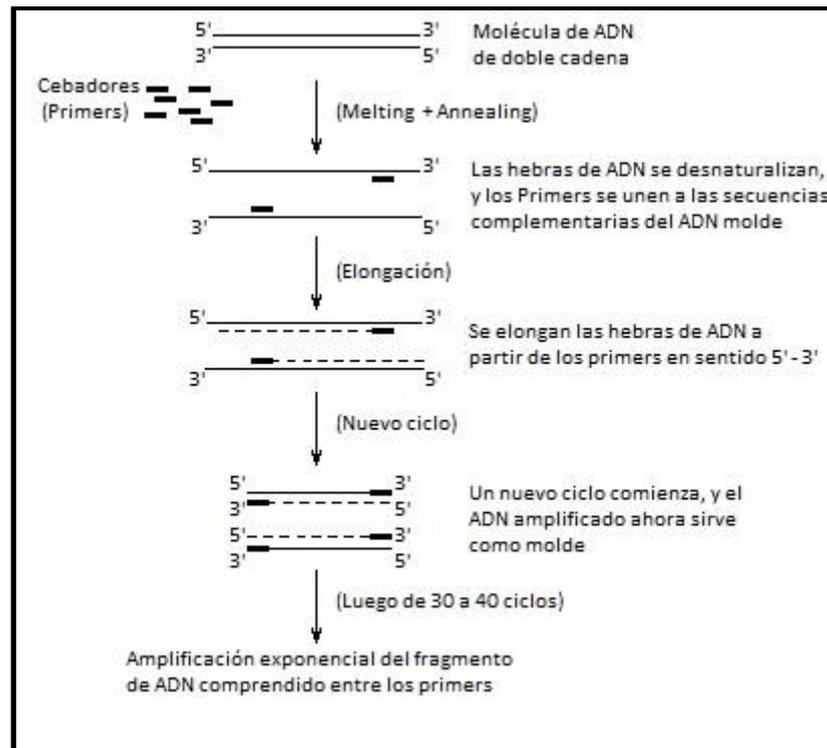
Llegado este punto en la reacción, los fragmentos polimerizados han vuelto a formar una doble cadena de ADN, por lo que el siguiente paso en la reacción será recomenzar el ciclo con el primer paso descrito –*melting*– de modo tal que se separen las dos hebras y vuelva a polimerizarse el fragmento de interés. El ciclo se repetirá tantas veces como sea necesario para asegurar una cantidad suficiente del fragmento de ADN para realizar ensayos posteriores, lo que normalmente sucede con unos 30 ciclos.

- **Terminación**

Una vez finalizada la totalidad de los ciclos, el equipo permanece un período largo de tiempo (unos 5 minutos aproximadamente) a 72°C para asegurar que todos los fragmentos sean amplificados completamente, y evitar así fragmentos truncos. Concluido este período normalmente se incluye un último paso, llamado “*hold*”, en el que los tubos de reacción permanecen en forma indefinida a 4°C, de modo tal que la

amplificación finalice y se conserve intacto el material genético hasta que sea utilizado, o bien se almacene apropiadamente (normalmente a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

En la **figura 1** se muestra un esquema que resume los pasos de una PCR, y cómo los fragmentos de interés se amplifican exponencialmente con cada ciclo subsiguiente.



**Figura 1.** Esquema de amplificación específica en una PCR. Fuente: Adaptación del trabajo de John J Kopchick et al, 2007.

Aunque los reactivos de la PCR son normalmente universales, es necesaria una puesta a punto de las cantidades de los mismos para un resultado óptimo en cada nuevo par de primers diseñado.

Dicho esto, listaremos a continuación el conjunto de reactivos necesarios para una PCR convencional, junto con una breve descripción de cada uno de ellos.

- **Taq Polimerasa:** Esta es la única enzima involucrada en la reacción de PCR, y es quien realmente realiza todo el trabajo durante la misma. Todos los demás reactivos serán para estabilizar y permitir el correcto funcionamiento esta enzima. Recibe su nombre por su origen, la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq), y por su función de polimerizar

nucleótidos siguiendo una cadena de ADN molde, o “templado”. La enzima no puede comenzar la polimerización si no cuenta con, al menos, un pequeño fragmento de ADN de doble cadena como punto de partida. Esta es la particularidad aprovechada en la PCR para que la amplificación sea altamente específica, dado que se diseñan los cebadores, o primers, para que sean complementarios únicamente al inicio y al final de la secuencia de interés. Si la hibridización primer-molde no sucede, la polimerización no sucede y esto asegura la ausencia de amplificaciones no deseadas.

- **Agua roux:** Este agua altamente pura será la base de todo el volumen de reacción. El nivel de pureza es necesario para evitar la presencia de iones que interfieran con el correcto funcionamiento de la taq polimerasa. Al mismo tiempo debe asegurar la ausencia de nucleasas, que pudieran destruir el material genético, y de proteasas, que interfieran con la acción de la taq polimerasa por proteólisis o por inhibición.
- **Buffer de Reacción:** Este Buffer es el que estabiliza el pH para el correcto funcionamiento de la polimerasa. El buffer es Tris-HCl con una concentración aproximada entre 10mM y 50mM y un pH entre 8.6 y 8.8. Se suele aclarar si el buffer contiene o no cationes  $Mg^{2+}$ , dada su importancia en la regulación de la actividad biológica de la taq-polimerasa.
- **MgCl<sub>2</sub>:** La polimerasa utiliza el catión  $Mg^{2+}$  como co-factor, por lo que debe agregarse en cantidad suficiente para asegurar su funcionamiento durante la totalidad de los ciclos de la PCR. Pequeñas variaciones en la concentración de esta sal tiene un enorme impacto sobre la eficiencia de la reacción.
- **dNTPs:** Se deben incluir las 4 bases nucleotídicas que la polimerasa utilizará como materia prima para copiar el ADN presente en la muestra. Se deben incluir cantidades equimolares de los 4 nucleótidos para evitar errores en la polimerización.
- **Primers:** Éstos son pequeños fragmentos de ADN diseñados de manera tal que hibridarán con el material genético molde. El objetivo es lograr pequeñas secuencias de ADN de doble cadena, necesaria para que la Polimerasa pueda iniciar la elongación.

- **Muestra:** Es la muestra que, potencialmente, contiene el ADN con el fragmento que se desea amplificar. Idealmente la misma debe ser libre de Nucleasas y Proteasas que puedan interferir con el resultado del ensayo.

Solo a modo de ejemplo se muestra a continuación la **Tabla I** con un protocolo de PCR para un ensayo estándar. Si bien las cantidades óptimas suelen variar para cada par de primers y muestra analizada, el ejemplo muestra una idea de la proporción en las que trabajan los reactivos en conjunto:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (µL)</b>
Agua Roux	19
Buffer Taq 10x	2,5
dNTPs	0,5
MgCl <sub>2</sub>	0,7
Primer Forward	0,3
Primer Reverse	0,3
Taq Polimerasa	0,2
Muestra	2,5

*Tabla I - Ejemplo de Protocolo para PCR*

## Diseño de Primers

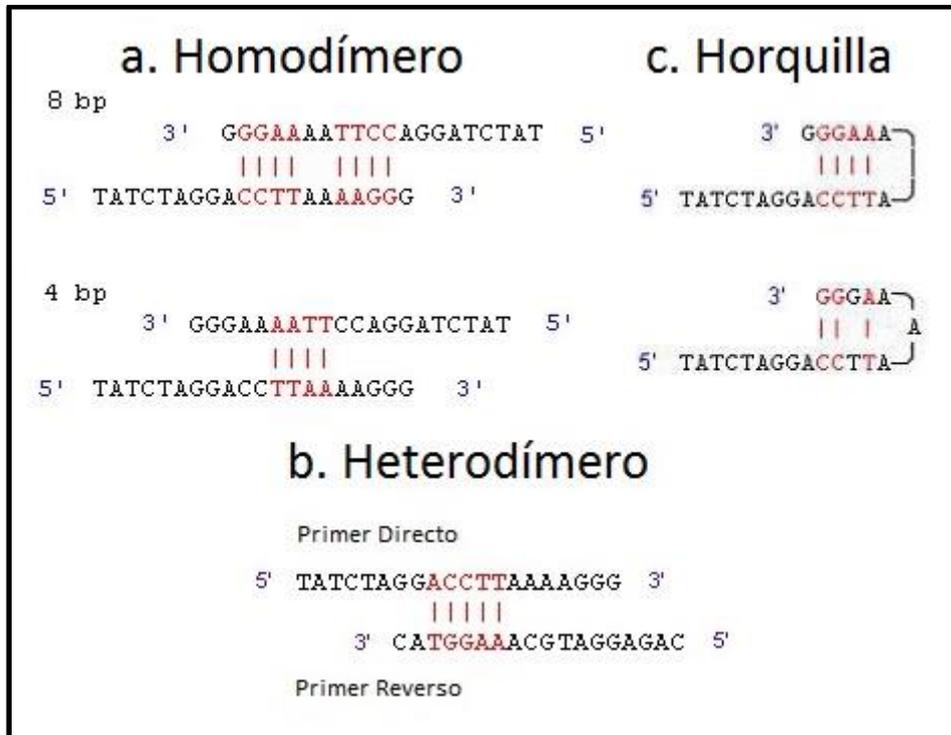
Como se mencionó anteriormente, los primers son pequeños fragmentos de ADN utilizados como sondas durante la PCR. Éstos serán los encargados de delimitar el fragmento que se quiere amplificar, de modo tal que la reacción sea altamente específica a los fragmentos de ADN que comiencen y terminen con las secuencias complementarias a los primers diseñados. Para esto es necesario conocer previamente la secuencia de nucleótidos que conforman los extremos 5' y 3' del material genético que se busca amplificar.

Para que la PCR amplifique correctamente el fragmento de interés, es fundamental un diseño de Primers adecuado. Sea cual sea el fragmento a amplificar, y cualquiera sea el material de origen, existen ciertos lineamientos básicos que deben respetarse para lograr un resultado exitoso. A continuación se muestran las nociones básicas que deben tomarse en consideración a la hora de diseñar un par de primers, y que impactan directamente en la sensibilidad y especificidad de los mismos.

- **Longitud de los primers:** La longitud recomendada para un par de primers es entre 20 y 30 nucleótidos, aproximadamente. Si se excede esta longitud, el resultado será demasiado astringente, y los primers podrían no hibridizar con el ADN molde durante la etapa de Annealing. Por el contrario, si es más corta, se aumenta la probabilidad azarosa de encontrar esa misma secuencia de nucleótidos en alguna región del ADN no deseada, produciendo amplificaciones no intencionadas. La longitud de los primers guarda una relación directa con la Temperatura de Melting, que describiremos más adelante, siendo tanto más alta cuanto más largo sea el primer.
- **Complementariedad con el molde:** La complementariedad con el ADN molde debe ser lo más exacta posible. Aquellos nucleótidos que no sean perfectamente complementarios a la secuencia del templado que se busca amplificar no hibridizarán con éste, y entorpecerá el trabajo de la polimerasa para iniciar la reacción. Al mismo tiempo, los nucleótidos que no encuentran su par aumentan las probabilidades de hibridizar con una secuencia no deseada en el templado. Por último, los extremos 5' de cada uno de los primers del par deben ser necesariamente complementarios, dado que este será el punto de partida exacto desde el cual comenzará a actuar la polimerasa.

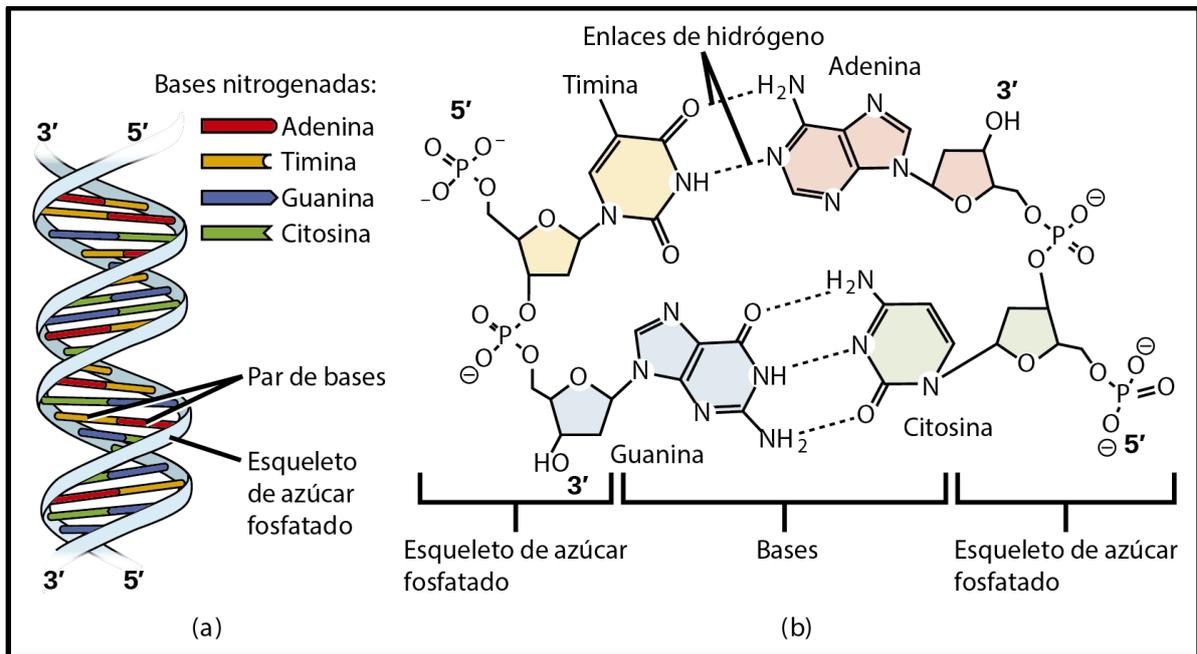
- **Especificidad:** Para que la amplificación de un fragmento de ADN resulte útil, se debe tener confianza en que la amplificación es lo suficientemente específica para el fragmento de interés. Esto se logra utilizando bases de datos genómicas de acceso público contra las cuales se censan los primers diseñados en busca de homologías con fragmentos de ADN del organismo en estudio. Estas bases de datos poseen infinidad de genomas de los organismos más diversos, por lo que es representativa de cualquier material genético con el cuál se podría tomar contacto. Si bien es altamente probable que la secuencia de los primers se encuentre representada al menos remotamente en varios organismos distintos al esperado, es trabajo de quien realiza el diseño de primers verificar la probabilidad de entrar en contacto con éstos organismos para descartarlos como posibles contaminantes. Idealmente, la secuencia de los primers que se utilizarán en la PCR para identificación deben poseer una escasa representatividad en el universo de muestras que puedan ser estudiadas por esa PCR en particular, y una altísima homología con la especie de interés, garantizando así la ausencia de falsos positivos. Por último, también debe tenerse en cuenta que al diseñar un par de primers siempre se hace con un tamaño de amplicón en mente. Si los primers fueran homólogos con algún organismo que pudiera interferir con la interpretación del ensayo, pero el amplicón que resultara de esta amplificación fuera de un tamaño muy distinto (por ejemplo, de un orden 10 veces mayor en pb), podría concluirse que esa amplificación no constituye un peligro para el revelado del gel de electroforesis, siendo muy fácilmente identificable como ajena al microorganismo estudiado.
- **Auto-Complementariedad y dímeros de primers:** Dado que los primers son esencialmente fragmentos cortos de ADN, éstos pueden hibridizar entre ellos si resultan ser complementarios. Si esto sucede, la polimerasa puede reconocer esta pequeña estructura de doble cadena y polimerizarla, generando amplificaciones espurias. Tal es el caso de lo que se conoce como “dímeros de primers”, amplificados a partir de la unión de dos primers auto-complementarios (**Figura 2.a**), o bien en complementariedad entre el Primer F y el Primer R (**Figura 2.b**). También debe evitarse la formación de estructuras secundarias en los primers, como las llamadas “horquillas”, que surgen del

plegamiento de una hebra simple de primer y su apareamiento consigo misma (**Figura 2.c**).



**Figura 2.** Distintas configuraciones de auto-complementariedad de primers. (Fuente: adaptación del trabajo publicado en [www.bioweb.uwlax.edu](http://www.bioweb.uwlax.edu))

- **%G-C:** Este parámetro está relacionado con la fuerza de interacción que tendrá el primer al hibridizar con el ADN. Como es sabido, las bases guanina y citosina (G y C respectivamente) al aparearse entre sí forman 3 enlaces de hidrógeno, unión que resulta más fuerte que los 2 puentes de hidrógeno formados por el apareamiento de las bases timina y adenina (T y A respectivamente). La **Figura 3** esquematiza este concepto para mayor claridad.



**Figura 3.** Apareamiento entre las bases nitrogenadas del ADN. (Fuente: Jerome Walker et al., (1953).

Por este motivo, se indica el porcentaje de G y C presente en la secuencia del primer, de tal modo de conocer qué tan estrecha será la unión del híbrido Primer-Molde. Usualmente se utiliza un rango entre el 40 y el 60% de G-C como valores normales.

- **Secuencias homopoliméricas:** La repetición consecutiva de un mismo nucleótido puede llevar a incompatibilidades con la PCR. Una región de nucleótidos repetitivos A o T resultaría en una zona de unión débil en el híbrido Primer-Molde, lo que podría resultar en la desestabilización del mismo. Por el contrario, regiones ricas en G o C consecutivas tendrían una unión muy estrecha, dificultando así el despegado del híbrido una vez elongado el fragmento. Como regla general, se recomienda que el primer no tenga repeticiones de más de 3 nucleótidos consecutivos.
- **Temperatura de melting:** Si bien este no es un parámetro que pueda modificarse directamente durante el diseño de los primers, la temperatura de melting es la consecuencia de la interacción entre un primer y el ADN molde complementario. Esta temperatura será calculada por el software utilizado para el diseño in-silico de los primers, teniendo en cuenta el largo de los primers, el %G-C y la complementariedad y

debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar el programa de la termocicladora. Como regla general, debe evitarse que la misma sea muy baja, para evitar un desacople del híbrido antes de la polimerización por parte de la taq polimerasa, y evitar también que sea muy alta, para asegurarse que en cada paso este híbrido se pueda “despegar” del molde para quedar disponible en el próximo ciclo de amplificación.

- **Extremo 3’:** El extremo 3’ será el punto exacto para el inicio de la polimerización por parte de la taq-polimerasa. Por este motivo, se recomienda que el extremo 3’ de los primers sea una unión fuerte, lo cual se logra con un nucleótido G o C en esa posición.

Si bien resulta indispensable tomarse el tiempo necesario con todas estas consideraciones en mente para un diseño in-silico óptimo, es inevitable la prueba experimental de los primers sobre la muestra que comprueben los resultados pronosticados.

## Electroforesis en gel de agarosa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una herramienta muy poderosa para lograr amplificar material genético de manera específica, aunque posee una ligera desventaja frente a los métodos colorimétricos: finalizada la reacción, el ensayo de PCR no genera un resultado inmediato. Esto quiere decir que para determinar si la reacción funcionó tal como lo esperado, y verificar el resultado de la misma, se debe contar con un segundo ensayo que permita evidenciar la presencia de los fragmentos de ADN.

Una primera aproximación podría ser una determinación de ADN total por Densidad Óptica (DO, por sus siglas en inglés), verificando así si la cantidad de material genético realmente se multiplicó. Para hacerlo, se construye una curva de calibración con cantidades conocidas de ADN, midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 260nm, la cual corresponde a la máxima absorbancia para ADN. Determinando la absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda y utilizando la curva, se puede estimar la cantidad de ADN total que contiene la muestra una vez amplificado, y compararlo con la muestra antes de amplificar. El problema con este método es que el resultado se refiere a la cantidad de ADN total en la muestra, de modo que es imposible verificar si verdaderamente se trata del fragmento de ADN en estudio, haciéndolo inservible para usar la PCR como herramienta de detección. Se necesita entonces un método que brinde algo más de información, y es donde la electroforesis en gel de agarosa entra en juego.

Para este ensayo, se construye una red de agarosa (un polisacárido de galactosa) por la cual el ADN podrá migrar, impulsada por la atracción eléctrica de dos electrodos conectados a cada extremo de la cuba que lo contiene. El esqueleto de fosfatos del ADN posee una carga negativa bajo las condiciones del ensayo, y esto se aprovecha para que éste migre hacia el electrodo positivo colocado en el otro extremo del gel. De esta manera, los fragmentos más cortos de ADN migrarán rápidamente entre las hebras del gel atraídas por su carga opuesta, mientras que los fragmentos más largos lo harán con mayor dificultad debido al impedimento físico que las fibras de agarosa imponen. La distancia a la que migran los fragmentos al finalizar la electroforesis es inversamente proporcional al tamaño de los mismos, y esta relación se mantiene constante para todos los fragmentos presentes en la muestra. Con esto en mente, y colocando una muestra de fragmentos de ADN de tamaños estándar como referencia, puede determinarse el tamaño de un fragmento por comparación de la distancia recorrida.

Los fragmentos de ADN, inician todos juntos su migración en una misma línea de partida denominada “punto de siembra”, y recorren el gel en una única dirección determinada por la posición del polo positivo. Al finalizar el ensayo se tendrán zonas discretas dentro del gel, cada una con fragmentos de ADN homogéneos, denominadas “bandas”. Cabe destacar que los fragmentos no necesariamente son exactamente iguales en cuanto a su secuencia nucleotídica, pero sí lo serán en cuanto a su tamaño. La manera más habitual de visualizar estas bandas en el gel es utilizando un fluoróforo que interactúe con el material genético, revelando así las posiciones de las bandas con altas concentraciones de ADN en el gel. El fluoróforo más utilizado es el Bromuro de Etidio, el cual actúa como intercalante de ADN. Este compuesto aromático se ancla entre las hebras del ADN de doble cadena en la muestra, y florece con un color anaranjado al ser irradiado por luz UV. Su fluorescencia en ausencia de ADN es 20 veces menor, por lo que la visualización de una banda anaranjada en el gel es una clara señal de presencia de material genético. La intensidad de la señal es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la banda, por lo que suele utilizarse para cuantificar aproximadamente la cantidad de material genético presente.



## Contenido

1. Descripción.....	2
2. Materiales incluidos .....	2
3. Materiales y reactivos requeridos no provistos en el kit. ....	2
4. Condiciones de almacenamiento .....	2
5. Cepas detectadas .....	3
6. Procedimiento.....	5
A. Preparación de la muestra.....	5
B. Preparación de la PCR.....	7
I. Preparación de la Master Mix .....	7
II. Alicuotado y colocación de muestras.....	7
III. Programa de la termocicladora.....	9
C. Electroforesis.....	9
7. Interpretación de resultados.....	9
8. Representación esquemática.....	11
9. Límite de detección .....	12
10. Recomendaciones.....	13

## 1. Descripción

**KDM- Kit de Detección de Mycoplasma** ha sido desarrollado para el periódico control de contaminación por micoplasma en cultivos celulares. Basado en la técnica de PCR, su sencilla y rápida aplicación, permite obtener resultados altamente confiables en unas pocas horas y lo convierten en una herramienta indispensable para cualquier laboratorio.

## 2. Materiales incluidos

- ✓ 6 tubos identificados como P4F, P4R, P5F, P5R, P6F y P6R, conteniendo los primers directos y reversos necesarios para llevar a cabo la detección de Mycoplasma.
- ✓ 2 tubos identificados como ActF y ActR, conteniendo los primers directos y reversos para la amplificación de ADN de Actina.
- ✓ 1 tubo identificado como C<sup>+</sup>, el cual contiene ADN purificado de Mycoplasma homnis.
- ✓ El presente instructivo.

## 3. Materiales y reactivos requeridos no provistos en el kit.

- ✓ Taq DNA Polimerasa
- ✓ Buffer de Taq Polimerasa 10X
- ✓ dNTPs
- ✓ MgCl<sub>2</sub>
- ✓ Agua Roux
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Tubos para PCR
- ✓ Agarosa

## 4. Condiciones de almacenamiento

Los componentes del kit son estables a temperatura ambiente por el período que abarque su entrega, no obstante, para su mejor conservación, se recomienda que los componentes del kit sean almacenados a -20°C.

## 5. Cepas detectadas

El kit ha sido verificado para la identificación inequívoca de *Mycoplasma hominis*. Sin embargo, el análisis de los juegos de primers que componen el presente kit, ha demostrado que existe la posibilidad de detectar la presencia de 70 cepas distintas de *Mycoplasma* con al menos un juego de primers, con un E-value significativo ( $<0,05$ ).

El detalle de las cepas con posibilidad de ser detectadas se muestran en la **Tabla I**.

MYCOPLASMA DETECTADO	P4		P5		P6		MYCOPLASMA DETECTADO	P4		P5		P6	
	Ev	AMP	Ev	AMP	Ev	AMP		Ev	AMP	Ev	AMP	Ev	AMP
M. adleri		NG	S	503		NG	M. iguanae	S	503	NS	500		NG
M. agalactiae	S	491	S	503		NG	M. indiese		NG	S	500	S	497
M. agassizii		NG	NS	501		NG	M. iners	S	490		NG		NG
M. alkalescens	S	501	NS	500	S	500	M. insons	NS	487		NG		NG
M. alvi	NS	486		NG		NG	M. iowae	NS	486		NG		NG
M. alligatoris		NG	NS	502		NG	M. lipofaciens		NG	S	503		NG
M. anatis	S	486		NG		NG	M. lipophilum		NG	S	502		NG
M. anseris		NG	NS	500	NS	499	M. maculosum	S	491		NG		NG
M. arginini	S	501	NS	500	S	500	M. meleagridis	S	491	S	500		NG
M. arthritis	S	501	S	500	S	499	M. microti	NS	486		NG		NG
M. auris		NG	NS	500	S	500	M. mobile	NS	499		NG		NG
M. bovinegenitalium	S	491	S	503		NG	M. molare	S	499		NG		NG
M. bovirhinis	S	485		NG		NG	M. mucosicanis	S	491	S	503		NG
M. bovis	S	491	S	503		NG	M. mustelae		NG	NS	502		NG
M. bovoculi	S	499	S	501		NG	M. mycoides	NS	499		NG	NS	501
M. buccale		NG	S	500	S	497	M. neophronis	S	501	NS	500	S	500
M. californicum	S	491	S	503		NG	M. neurolyticum	S	499		NG		NG
M. canadense	S	501	NS	500	S	500	M. opalescens	S	490	S	503		NG
M. canis	S	485		NG		NG	M. orale	S	501	S	500	S	497
M. caviae		NG	S	503		NG	M. ovipneumoniae	S	499		NG	NS	501
M. citelli	S	486		NG		NG	M. parvum	S	473		NG		NG
M. cloacale		NG	S	500	NS	500	M. penetrans	NS	486		NG		NG
M. columbinasale		NG	S	503		NG	M. phocicebrale	S	501		NG	S	499
M. collis	S	499		NG		NG	M. phocidae	S	501	S	500	S	499
M. columbinum	S	491	S	504		NG	M. phocirhinis	S	491	S	503		NG
M. columborale	S	486		NG		NG	M. pneumoniae	NS	486		NG		NG
M. conjunctivae	S	500	S	501		NG	M. pullorum	S	486		NG		NG
M. cricetuli	S	486		NG		NG	M. pulmonis	S	501		NG	NS	498
M. crocodyli	NS	486	NS	501		NG	M. salivarium	S	501	S	501	S	501
M. cynos	S	485		NG		NG	M. simbae		NG	S	503		NG
M. edwardii	S	485		NG		NG	M. sp. CSL7518-lung	NS	491		NG		NG
M. elephantis		NG	S	500		NG	M. sp. Mirounga	NS	501	NS	500		NG
M. equigenitalium		NG	S	500		NG	M. sp. 'ovine/caprine serogroup 11'	NS	491	NS	503		NG
M. equirhinis		NG	S	500	S	499	M. sp. Phocoena	NS	501		NG		NG
M. falconis		NG	NS	500	S	500	M. sp. Sgv2a	NS	501		NG		NG
M. faucium		NG	S	500	S	497	M. sp. Sgv2b	NS	501		NG		NG
M. felifaucium		NG	S	503		NG	M. sp. Sgv2c	NS	501		NG		NG
M. feliminutum		NG	S	499		NG	M. sp. Sgv2d	NS	501		NG		NG
M. fermentans	S	491	S	503		NG	M. sp. Sgv2e	NS	501		NG		NG
M. flocculare	NS	499		NG		NG	M. spermatophilum		NG	S	503		NG
M. gallinarum	S	491	S	503		NG	M. sphenisci	S	490		NG		NG
M. gallopavonis	S	486		NG		NG	M. spumans	S	501	NS	500	S	500
M. gateae		NG	NS	500	S	499	M. subdolum		NG	NS	500	S	497
M. genitalium	NS	488		NG		NG	M. synoviae	S	485		NG		NG
M. haemocanis	NS	470		NG		NG	M. testudinum	S	499		NG	S	499
M. haemofelis	NS	470		NG		NG	M. timone		NG	NS	500	NS	497
M. hominis	S	499	S	500	S	499	M. verecundum	S	486	S	502		NG
M. hyopneumoniae	NS	499		NG		NG	M. vulturii	S	517		NG		NG
M. hyorhinis	S	499	NS	501		NG	M. zalophi	NS	501	NS	500		NG
M. hyosynoviae		NG	S	500	S	497	M. zalophidermidis	NS	491		NG		NG

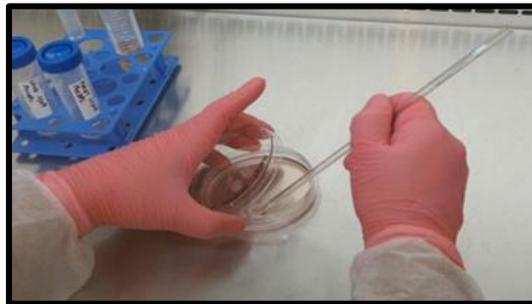
**Tabla I:** *Mycoplasmas detectados en el análisis de primers. Ev=E-value; AMP = amplicón generado (en bp); NG = no genera; S = significativo (E-value <0,05); NS = no significativo; P4 = Juego de primers P4; P5 = juego de primers P5; P6 = juego de primers P6.*

## 6. Procedimiento

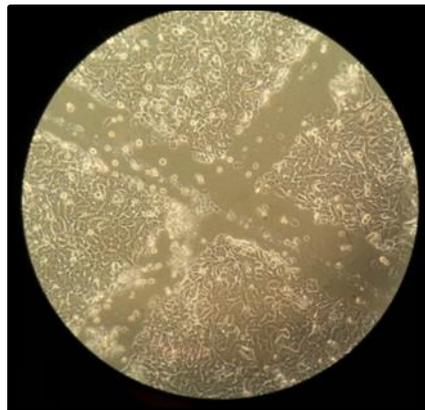
### A. Preparación de la muestra

**KDM- Kit de Detección de Mycoplasma** ha sido optimizado para muestras de sobrenadante de cultivos celulares de líneas humanas, sin tratamiento con antibióticos específicos para micoplasma. Para aumentar la sensibilidad del test, los cultivos deben estar al 90-100% de confluencia y haber pasado al menos 48 hs. desde el último cambio de medio.

- I. Raspar la base de la placa de cultivo con una pipeta como se muestra en la Fig. 1 y verificar el desprendimiento celular como se indica en la Fig. 2.

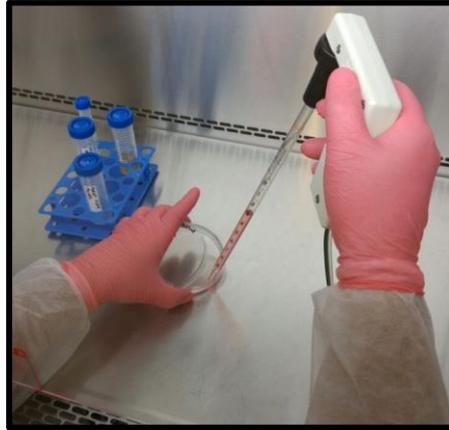


*Figura 1: Raspado de placa*



*Figura 2: Desprendimiento celular.*

- II. Tomar todo el sobrenadante y colocarlo en un tubo Falcon estéril como se muestra en las Fig.3 y 4.



*Figura 3: Toma de sobrenadante.*



*Figura 4: Resguardo de muestra.*

- III. Calentar la muestra en un baño termostático a 95°C durante 10 minutos para inactivar las nucleasas que pudieren estar presentes en la muestra y, de este modo, preservar el ADN que servirá como templado en la reacción de PCR. La muestra así tratada puede ser almacenada a -20°C para su uso posterior o enfriada hasta temperatura ambiente para su uso inmediato.
- IV. Tomar 1mL de sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf de 1,5mL.
- V. Centrifugar a 13400 r.p.m. durante 30 segundos.
- VI. Cuidadosamente tomar 950µL (sin desprender el pelet) y colocarlos en otro tubo eppendorf. La muestra así tratada está lista para ser usada en la reacción de PCR.

## B. Preparación de la PCR

### I. Preparación de la Master Mix

- a) Rotular 3 tubos eppendorf como M4, M5 y M6, para las master mix de los juegos de primers P4, P5 y P6.
- b) Colocar en cada uno de ellos 80µL de agua Roux.
- c) Agregar a cada tubo 10µL de buffer de Taq Polimerasa 10X.
- d) Agregar a cada tubo 2µL de mix de dNTP's 10mM.
- e) Agregar a cada tubo 3µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM
- f) Agregar a cada tubo 1µL del contenido del tubo identificado como ActF
- g) Agregar a cada tubo 1µL del contenido del tubo identificado como ActR
- h) Agregar al tubo M4 1µL del contenido del tubo P4F
- i) Agregar al tubo M4 1µL del contenido del tubo P4R
- j) Agregar al tubo M5 1µL del contenido del tubo P5F
- k) Agregar al tubo M5 1µL del contenido del tubo P5R
- l) Agregar al tubo M6 1µL del contenido del tubo P6F
- m) Agregar al tubo M6 1µL del contenido del tubo P6R
- n) Agregar a los tubos M4, M5 y M6 1µL de *Taq* Polimerasa 5U/µL.
- o) Homogeneizar suavemente los tubos M4, M5 y M6.

### II. Alicuotado y colocación de muestras.

- a) Rotular 9 tubos para PCR con los números del 1 al 9. A los tubos 1, 2 y 3, colocar 25µL de la master mix M4, a los tubos 4, 5 y 6, colocar 25µL de la master mix M5 y a los tubos 7, 8 y 9 colocar 25µL de la master mix M6.
- b) Agregar a los tubos 1, 4 y 7, 1µL de medio de cultivo fresco (estos tubos son los controles negativos).
- c) A los tubos 2, 5 y 8 agregar 1µL del tubo de control positivo.
- d) Por último, agregar a los tubos 3, 6 y 9, 1µL de muestra. Se recomienda centrifugar la muestra a 13400 r.p.m durante 30 segundos antes de ser utilizada en la reacción de PCR.

**Nota:** El protocolo descrito en B.I y B.II es el que debe utilizarse para testear una única muestra de cultivo. Para testear 2 o más muestras simultáneamente, se deben preparar las master mix, para cada juego de primers, siguiendo el detalle de la Tabla II y procediendo de la siguiente manera:

- Realizar la ecuación Ec. (1)

$$f = (2 + x) \cdot 1,2 \quad \text{Ec. (1)}$$

Siendo x = cantidad de muestras a testear, y f el valor del factor resultado.

- Multiplicar el volumen de cada reactivo indicado en la Tabla II por el factor f obtenido.
- El volumen de cada reactivo así obtenido es el que debe alicuotarse para cada master mix.

Reactivos	Volumen (µL)
Agua Roux	20
Buffer 10X	2,5
dNTP's 10 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,75
Primer Micoplasma Directo 10µM	0,25
Primer Micoplasma Reverso 10µM	0,25
Primer Actina Directo 10µM	0,25
Primer Actina Reverso 10µM	0,25
Taq Polimerasa 5U/µL	0,25

**Tabla II:** Reactivos y cantidades de cada reactivo necesarios para 1 reacción de PCR. La cantidad de muestra necesaria que hay que agregar es de 1µL.

### III. Programa de la termocicladora

Programar la termocicladora como se indica en la Tabla III.

Cantidad de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (Seg)
1	Desnaturalización inicial	95	300
35	Desnaturalización	94	60
	Hibridización	55	60
	Elongación	72	30
1	Elongación final	72	600

*Tabla III: Cantidad de ciclos, tiempos de cada ciclo y temperaturas.*

### C. Electroforesis

Para la electroforesis se debe preparar un gel de agarosa al 1% en 120mL de buffer T.A.E al 1% y agregarle 6µL de bromuro de etidio al 1%.

Preparar las muestras a sembrar con buffer de siembra 6X.

Para la siembra del gel, se recomienda sembrar la totalidad del volumen contenido en los tubos de PCR, sin embargo, una siembra de 10µL resulta suficiente para la correcta visualización de las bandas.

El orden de la siembra debe seguir en orden ascendente la numeración de los tubos de PCR.

Se debe correr el gel a 120 Volts y 280mA durante 40 minutos.

### 7. Interpretación de resultados

Tal como se muestra en la Tabla I, el tamaño de las bandas que pueden observarse en el gel de agarosa, depende de la cepa detectada y del juego de primers que la haya

detectado. En la Tabla IV, se muestran los posibles resultados para la confirmación positiva de presencia de Micoplasma en la muestra.

P4		P5		P6		Interpretación
Bandas visualizadas		Bandas visualizadas		Bandas visualizadas		
470- 517 pb	300 pb	499 – 504 pb	300 pb	497 – 501 pb	300 pb	Presencia De micoplasma ( <i>Mollicutes</i> )
SI	SI	SI	SI	SI	SI	
SI	SI	NO	SI	SI	SI	
SI	SI	SI	SI	NO	SI	
NO	SI	SI	SI	SI	SI	
SI	SI	NO	SI	NO	SI	
NO	SI	SI	SI	NO	SI	
NO	SI	NO	SI	SI	SI	

**Tabla IV:** posibles resultados para la identificación positiva de micoplasma.

**IMPORTANTE:**

➤ **Control Interno**

La ausencia de la banda de 300 pb. en cualquier juego de primers, puede estar indicando un FALSO NEGATIVO si en la misma calle tampoco se observa banda para Micoplasma. La ausencia de banda de 300 pb. en cualquier juego de primers, con presencia de banda para Micoplasma indica una falla en el raspado de la placa previo a la toma de la muestra.

➤ **Control Positivo**

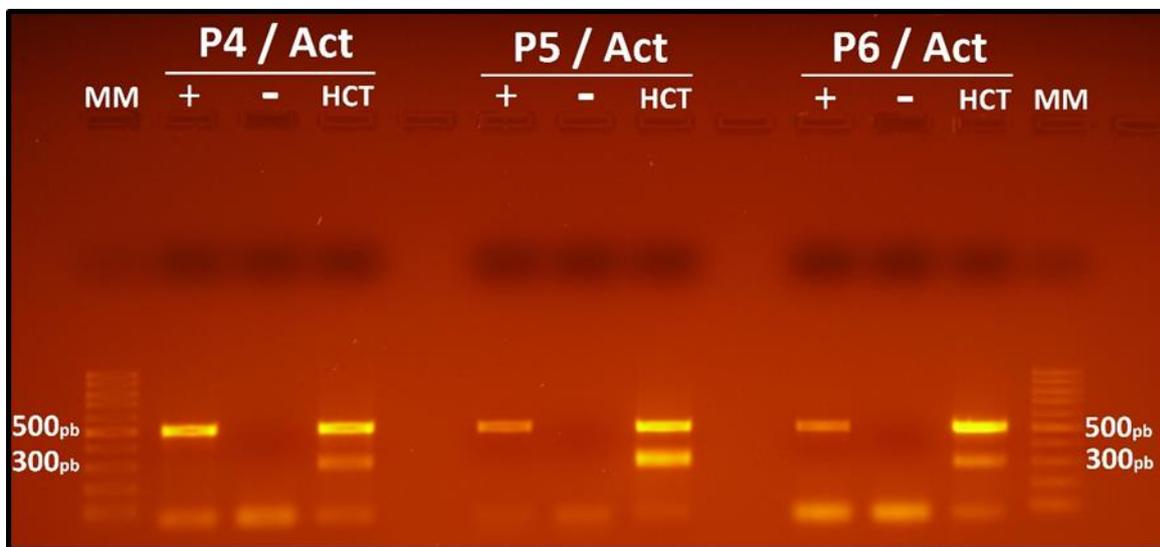
La banda para las calles de control positivo deben ser de 499 pb. para el juego de primers P4, de 500 pb. para el juego de primers P5 y de 499 pb. para el juego de primers P6. La usencia de la banda de control positivo puede indicar, tanto la degradación del ADN de Mycoplasma hominis como el mal funcionamiento de la PCR.

➤ **Control Negativo**

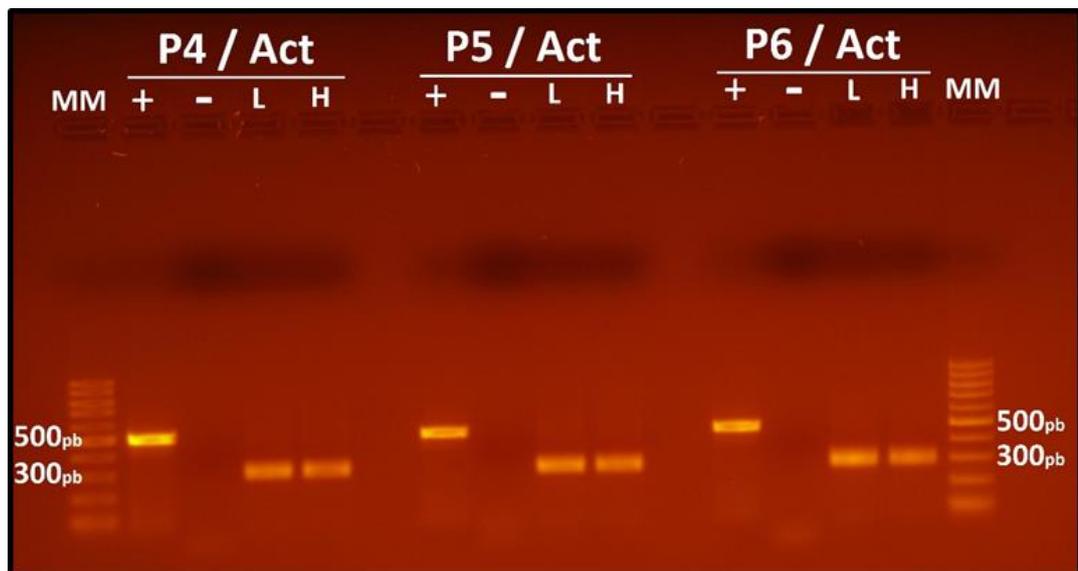
La presencia de banda para Micoplasma en la calle de control negativo, indica contaminación en uno o más reactivos y el resultado para ese juego de primers debe ser descartado.

**8. Representación esquemática**

En las Fig. 5 y 6, se presentan ejemplos de análisis realizados en sobrenadante de líneas celulares HCT-116, LoVo y HaCat, con y sin presencia de Micoplasma.



**Figura 5:** Ejemplo de contaminación positiva. Resultado del análisis realizado sobre la línea celular HCT-116. Gel de Agarosa al 1%. Calles 1 y 13, marcador 100 bp marca SIGMA; calles 2, 3 y 4 corresponden al juego de primers P4. Calles 6,7 y 8 corresponden al juego de primers P5. Calles 10, 11 y 12 corresponden al juego de primers P6. Todos los juegos de primers se sembraron en el orden: control positivo, control negativo, calle de muestra. Calles 5 y 9 son calles vacías para mayor claridad.

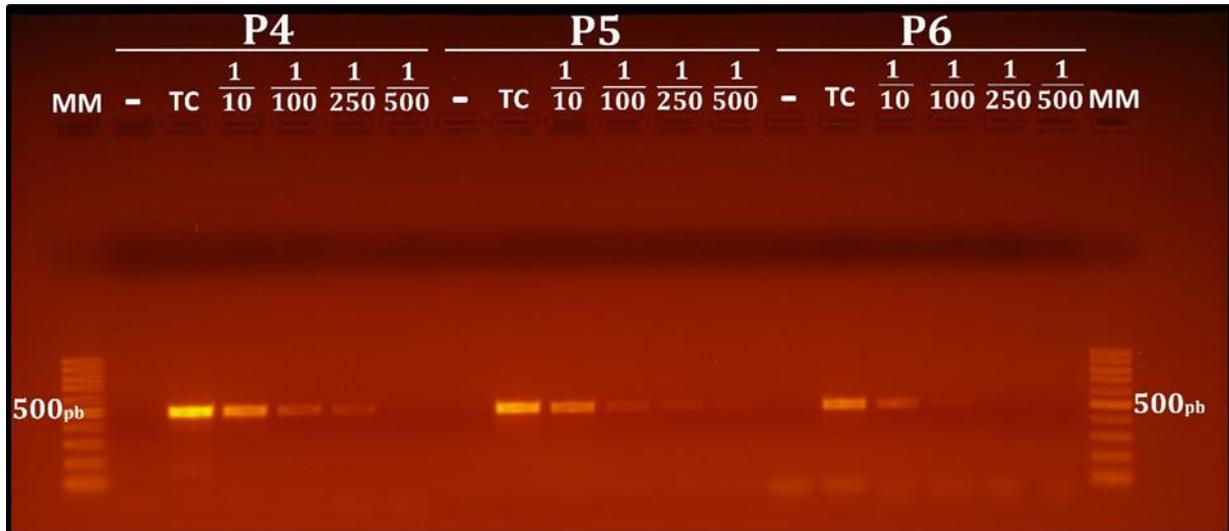


**Figura 6:** Ejemplo de contaminación negativa. Resultado del análisis realizado sobre las líneas celulares LoVo y HaCat. Gel de Agarosa al 1%. Calles 1 y 16, marcador 100 pb marca SIGMA; calles 2, 3, 4 y 5 corresponden al juego de primers P4 en el orden: control positivo, control negativo, calle de muestra de línea LoVo, calle de muestra línea HaCat. Calles 7, 8, 9 y 10 corresponden al juego de primers P5. Calles 12, 13, 14 y 15 corresponden al juego de primers P6. Los primers P5 y P6 fueron sembrados en el mismo orden que los primers P4. Calles 6 y 11 son calles vacías para simplificar el análisis.

## 9. Límite de detección

El límite de detección para este kit, se ha establecido utilizando ADN comercial de *Mycoplasma hominis*. Partiendo de una concentración de 19.000 copias/ $\mu$ L y realizando diluciones 1/10, 1/100, 1/250 y 1/500, se ha determinado que la concentración mínima de ADN que este kit permite detectar es de 76 copias/ $\mu$ L.

En la Fig. 7, se ilustra la intensidad de las bandas obtenidas para cada dilución.



**Figura 7:** Intensidad de las bandas obtenidas para cada juego de primers según la dilución utilizada. Gel de Agarosa al 1%, revelado con Bromuro de Etidio. Calles 1 y 20, marcador 100 bp marca SIGMA; Calles 2 a 7, corresponden al juego de primers P4 en el orden: control negativo, dilución “tal cual”, dilución 1/10, dilución 1/100, dilución 1/250, dilución 1/500. Calles 8 a 13 y 14 a 19 corresponden a los juego de primers P5 y P6 respectivamente, respetando el mismo esquema de siembra. Se sembraron 10 uL para cada calle.

## 10.Recomendaciones

### ➤ Contaminaciones

Se recomienda realizar la preparación de las Master Mix, el alicuotado de las mismas y el agregado del control negativo, dentro de un flujo laminar **NO** utilizado para la preparación y/o plaqueo de cultivos bacterianos y realizar una exhaustiva limpieza del mismo antes de proceder a la utilización de este kit.

Para la colocación de las muestras y del control positivo, en los tubos de PCR correspondientes, se recomienda utilizar un sector separado del flujo laminar a fin de evitar contaminaciones en los tubos de control negativo. Este lugar debe estar limpio y debe utilizarse un mechero de esterilidad.

➤ **Alícuotas**

Se recomienda alicuotar tanto los juegos de primers como el control positivo, a fin de evitar posibles degradaciones del material contenido en los tubos, por sucesivos procesos de congelado y descongelado, y aumentar el tiempo de vida útil de los reactivos contenidos en el kit.

➤ **Master Mix**

Se recomienda mantener los tubos de master mix (y todos los demás reactivos) en hielo durante su preparación.

➤ **Diluciones**

El control positivo se provee con una concentración inicial de 19.000 copias/ $\mu$ L. Éste, podrá ser diluido a criterio de cada usuario.

Para la dilución del control positivo, recomendamos utilizar agua ADN-free y guiarse por la Fig. 7 para la elección de la dilución.





Product Sheet

## DMEM: F-12 Medium (ATCC® 30-2006™)

Please read this FIRST



Storage Temp.  
**Store medium at 2°C to 8°C in the dark when not in use.**

---



Biosafety Level  
\*

### Description

**Product Description:** DMEM: F-12 Medium contains 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, 0.5 mM sodium pyruvate, and 1200 mg/L sodium bicarbonate.

**Volume:** 500 mL

### Directions for Use

#### Formulation

Contains 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, 0.5 mM sodium pyruvate, and 1200 mg/L sodium bicarbonate **NOTE:** This reduced level of sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 g/L) is intended for use in a 5% CO<sub>2</sub> in air. Additional sodium bicarbonate may be required for use in incubators containing higher percentages of CO<sub>2</sub>.

#### Quality Control Specifications

Sterility tests are performed on each lot of medium using current USP methods. Each lot of medium is also checked for its ability to support the growth of several different cell lines using both sequential subcultures and plating efficiencies. Additional test results are listed in the Certificate of Analysis.

Test*	Specification
pH	7.0 to 7.4
Osmolality	285 to 365 mOsm/kg
Sterility Testing	Pass
Endotoxin	≤ 0.5 EU/mL
Mycoplasma	Pass
Growth Promotion	Pass

\*Please consult the Certificate of Analysis for lot-specific test results.

### ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).  
© ATCC 2016. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [04/28]

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor



Product Sheet

## Fetal Bovine Serum (FBS) (ATCC® 30-2020™)

Please read this **FIRST**

Storage Temp.  
**Store fetal bovine serum at -20°C or colder. Do not store frozen fetal bovine serum at temperatures above -20°C for any length of time. Avoid repeated freeze-thaws by dispensing and storing fetal bovine serum in aliquots. Fetal bovine serum is supplied in PETG plastic bottles.**



Biosafety Level  
\*

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

### Description

**Product Description:** Triple filtered through 0.1 µm filters. Each lot of fetal bovine serum is tested for sterility and for the ability to support the growth of several different cell lines using both sequential growth curves and plating efficiencies. Fetal bovine serum is manufactured from fetal bovine blood collected in USDA-inspected abattoirs located in the United States.

**Volume:** 500 mL

### Directions for Use

#### Thawing

Remove serum from frozen storage and place the bottle(s) overnight in a refrigerator at 2°C to 8°C. Gently agitate the bottle(s) from time-to-time in order to mix the solutes that tend to concentrate at the bottom of the bottle. Do not keep serum at 37°C any longer than necessary for it to thaw completely. Alternatively, serum bottles may be placed in a 37°C water bath directly from frozen storage. Do not thaw serum at temperatures above 37°C. Bottles should be agitated by a gentle swirling motion to enhance mixing and thawing.

If you are not using all of your thawed serum at once, it is recommended to dispense it into single-use aliquots and store these at -20°C or colder. Temporary storage of thawed serum at 2°C to 8°C may be acceptable, depending on the customer application. This should be validated by the customer prior to implementation.

#### Serum Precipitates

Turbidity and flocculent material may be present after thawing. ATCC's experience indicates that neither of these changes affects the performance of serum. If the presence of flocculent material or turbidity is a concern, they can be removed by aseptic filtration through a sterile 0.45 µm filter.

#### Heat-Inactivation of Serum

**CAUTION:** Heat-inactivation of serum is usually unnecessary and can be detrimental to the growth of some cells. We strongly recommend that you heat-inactivate serum only if it is required for a particular cell line.

1. Thaw serum following the directions above.
2. Preheat a water bath to 56°C with sufficient water to rise above the level of the serum in the bottle.
3. Mix thawed serum by gently swirling the bottle and then place the bottle in the 56°C water bath. (The temperature of the water bath will decrease.)
4. When the temperature of the water bath reaches 56°C again, heat the serum for an additional 30 minutes. Mix gently every five minutes to insure uniform heating.
5. At the end of 30 minutes, remove serum from the water bath, cool, and store at -20°C or colder.

### ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/30]



Product Sheet

# L-Glutamine Solution, 200 mM (ATCC® 30-2214™)

Please read this FIRST

Storage Temp.  
**Store L-glutamine solution frozen at -20°C or colder. Avoid repeated freeze-thaws by dispensing and storing in aliquots.**



---

 Biosafety Level  
**1**

## Description

### Product Description:

L-Glutamine 200 mM Solution (29.23 mg/mL). L-Glutamine is an essential amino acid required by virtually all mammalian and insect cells grown in culture. L-Glutamine is also more labile in cell culture solutions than other amino acids. The rate and extent of L-glutamine degradation are related to storage temperatures, age of the product, and pH.

All cell culture media are formulated to contain appropriate amounts of L-glutamine to support cell growth well beyond the expiration date of the media. However, if L-glutamine is suspected to be a limiting factor during cell culture, a simple test of 'spiking' the medium with a small amount of L-glutamine will determine whether or not more is required. Simply add a small amount of L-glutamine (~ 2 mM final concentration) to the culture medium. If the cell growth rate increases, L-glutamine is most likely deficient and more should be added.

**Volume:** 100 mL

## ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

## Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [05/13]

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

NAME OF PRODUCT: AMPLIRUN® MYCOPLASMA HOMINIS DNA CONTROL  
 REF: MBC084  
 LOT NR: 15MBC084001  
 EXPIRY DATE: 2017/07

Kit Contents	Lot Nr	Expiry Date (year/month)
VIRCELL DNA CONTROL	15MBC084101	2017/07
VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION	14MBCRS002	2019/09
VIRCELL PRIMERS		

### QUALITY CONTROL

KIT CONTENT	ANALYSIS	RESULTS	SPECIFICATIONS
Nucleic acid	PCR/RT-PCR ANALYSIS	78,4 °C	Identity Test: 77,9 - 78,9 °C Forward Primer: Mhom F2 Reverse Primer: Mhom R2
	PURITY	2,2	1,5 - 2,2 A260/280
	CONCENTRATION copies/µl	19000 copies/µl	10.000 - 20.000 copies/µl

This is to certify that the above kit is performing according to the Quality Control specifications of VIRCELL, S.L.

All VIRCELL products are manufactured under an ISO 9000 and ISO 13485 certified quality system and are in conformity with the applicable essential requirements of the Council Directive 98/79/EC for in vitro Diagnostic Medical Devices.

Q.C. TESTING BY:

DATE: 23/01/2015



MARI LUZ ARENAS



3050 Spruce Street  
Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sial.com  
sigma-aldrich.com

## Product Information

### PCR 100 bp Low Ladder

Catalog Number **P1473**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### Product Description

The PCR 100 bp Low Ladder has been especially designed for size determination of PCR generated DNA fragments. The recommended agarose gel concentration is 2.0%. The ladder contains 10 bands, ranging from 100–1,000 bp in exact 100 bp spaced (ladder) recombinant repeats.

<u>DNA Sizes:</u> base pairs (bp)	
1,000	500
900	400
800	300
700	200
600	100

The ladder is supplied as a solution in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.0, with 1.0 mM EDTA. One vial is sufficient for 75 applications.

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Storage and Stability

This product is shipped at ambient temperature and storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  is recommended.

#### Procedure

The following procedure may be used as a guideline. The ladder should be diluted with gel loading buffer to the desired loading concentration. Adjustments may be made for different well sizes and individual preferences.

Preparation of the PCR Ladder for electrophoresis:

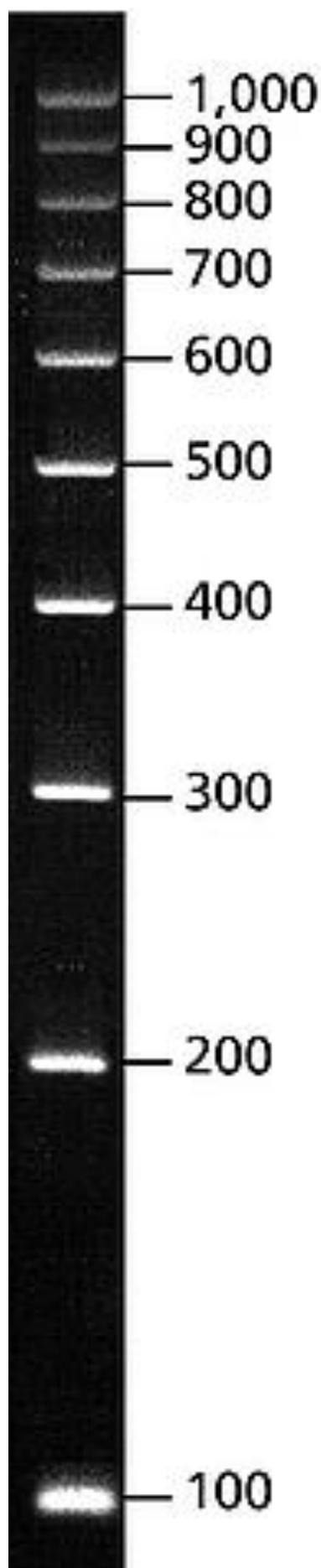
- 5  $\mu\text{l}$  PCR Ladder
- 5  $\mu\text{l}$  water
- 2  $\mu\text{l}$  Gel Loading Buffer (Catalog Number G2526)

The entire 12  $\mu\text{l}$  of the prepared PCR Ladder solution was loaded on a 2.0% agarose submarine type minigel and run at 90 volts in 1 $\times$  TBE buffer (Catalog Number T9525) until the bromophenol tracking dye reached the bottom of the gel. After staining for 15–20 minutes in 5  $\mu\text{g/ml}$  ethidium bromide and destaining with water for 15–20 minutes, the resulting banding pattern was consistent with the indicated DNA sizes.

#### Notes:

1. Well Thickness: For best resolution of DNA bands, use only properly formed sample wells,  $\leq 1$  mm in thickness.
2. Salt Concentration: It is important to accurately match the salt concentration of the prepared PCR Ladder solution to that of the DNA being evaluated in order to obtain the best size determinations. One useful technique for very precise sizing of sample fragments, which eliminates concerns over matching salt concentrations, is to co-electrophorese the sample and the ladder in the same well. Ladder-only and sample-only lanes should be run to aid in interpretation of electrophoresis patterns.
3. Anomalies: The 100 bp ladder may show a double or triple-banding pattern in some types of polyacrylamide gels, particularly under higher run temperatures.

AK,MAM 11/06-1



Nombre	Dirección	Secuencia de 5' a 3'	Longitud (pb)	TM (°C)	%GC	Inicio	Fin	Amplicón (pb)
P1	Directo	CGTAGATGTCCGAATGGGGG	20	59.97	60	2895	2914	498
	Reverso	ACTTCAAACGCACGCCATC	20	60.04	50	3392	3373	
P2	Directo	CATGTGGAGCGGTGAAATGC	20	60.18	55	1295	1314	496
	Reverso	TTGACGTCATCCCCACCTTC	20	59.68	55	1790	1771	
P3	Directo	TCATCCTCGAGCTGAAGCAG	20	59.54	55	5318	5337	503
	Reverso	TTCTGGGTTCCGAATGGGAC	20	59.67	55	5820	5801	
P4	Directo	ATCGGAGTGACAGATGGTGC	20	59.82	55	1014	1033	499
	Reverso	GGTGATCCATCCCCACGTTTC	20	60.46	60	1512	1493	
P5	Directo	TTAGTTGGTGAGGTAATGGCCC	22	60.03	50	241	262	500
	Reverso	ATAGACCCAGTAAGCTGCCTTC	22	59.56	50	740	719	
P6	Directo	AAACAATGGCTAATGCCGGATAC	23	59.68	43.48	145	167	499
	Reverso	GTTTGCTAGTATCCAAAGCGAGC	23	60.24	47.83	643	621	
Act	Directo	ATGCTTCTAGGCGGACTATGAC	22	59.7	50	7845	7866	301
	Reverso	ATGGCAAGGGACTTCCTGTAAC	22	60.29	50	8145	8124	
GAPDH M	Directo	TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG	22	61.47	50	435	456	300
	Reverso	AGTGATGGCATGGACTGTGGTC	22	62.59	54.55	734	713	
GAPDH F	Directo	TCATTTCTGGTATGTGGCTGG	22	60.36	50	8497	8518	301
	Reverso	TCATTTCTGGTATGTGGCTGG	22	60.09	54.55	8797	8776	

**Anexo H** - Tabla con los datos de todos los primers diseñados y testeados. Los pares de primers P4, P5, P6 y Act (resaltados en Verde) son los que conforman la versión final del Kit. Referencias: TM = Temperatura de Melting. Inicio/Fin = Posición relativa de la primer y última base del primer dentro de la secuencia estudiada, respectivamente. Amplicon: Tamaño del amplicón buscado.