

## 1. 實驗前準備

### A. 檢體 DNA:

#### I. 檢體來源:

檢體來源通常為培養的細胞，PCR抑制物質可能累積於培養液，所以在PCR測試之前，純化DNA的步驟不可少。一般抗生素 (如penicillin, streptomycin)不會影響本試劑的敏感度。細胞培養的懸浮液可用來檢測黴漿菌，細胞本身(cell pellets) 因細胞碎片(debris)會干擾PCR反應故不適用。細胞培養的數目在 $10^6$ ~ $10^8$ 之間為最佳測試濃度。但是細胞本身、疫苗、血清及切片檢體經DNA 純化後就可進行黴漿菌檢測。

#### II. 細胞懸浮液處理

DNA 的製備可從細胞懸浮液或其他生物檢體來進行，約 5 分鐘。

1. 加入 100µl 細胞懸浮液於滅菌過的 1.5CC 離心管，蓋緊。
2. 煮 95°C，5 分鐘
3. 離心13000 rpm，5 sec，來沉澱細胞碎片，懸浮液可進行黴漿菌檢測。

### B. 準備 PCR 試劑

#### I. Venor GEM試劑

原廠試劑組有:

@紅頭管: Primer/Nucleotide Mix (乾躁包裝含有primers 及 dATP, dCTP, dGTP 及dUTP)。

@綠頭管:Positive control DNA (乾躁包裝含有Mycoplasma pneumonia DNA 的 PCR 產物)。

@黃頭管:Internal Control DNA (乾躁包裝含有plasmid DNA)。

@藍頭管:PCR 反應緩衝液(500ul, 10x PCR reaction buffer,適用MB TAQ DNA Polymerase)。\*\*\*注意:若您的Taq polymerase非MB *Taq polymerase* (cat #53-0050, 53-0100, 53-0200, 53-0250)，請使用*Taq polymerase*製造商提供的 **Buffer**。

@白頭管:PCR級的純水。

原廠是乾躁試劑包裝，故第一次使用時請依下列驟:

- 以桌上型 13000rpm 離心機-最高速離心5 sec
- 加入 去離子DNA-free water(白頭管)，如下:

primer/nucleotide mix (per portion of 25 reactions) 65µl (紅頭管) (如果是trail kit則

加入15µl，因為只供應5個反應)

positive control 300 µl (綠頭管)

internal control 300 µl (黃頭管)

- 適溫靜置 5 minutes

- 簡易震盪並最高速離心5 sec

**注意：加水之後請保存于-18°C**

## II 其他試劑 (未包含于 Venor GEM kit)

### (1)Taq polymerase

建議廠牌: (PCR buffer 請配合Taq polymerase之廠牌)

The test is designed to work with standard Taq DNA polymerases. The following polymerases were tested and can be recommended for use with this kit.

Taq DNA polymerases with excellent results (in alphabetical order)

Company	Product Number
Bioron	S115001; 117005
Cambio HT Technologies	020511 TP05xx
Epicentre	Q82100
Invitrogen	10966-018
Minerva Biolabs	MBT-200
Promega	M1661
Qiagen	203203
Sigma	D1806, D4545
Stratagene	600280

(2)去離子水- DNA-free

(3) Agarose gel

## C. 黴漿菌檢測步驟

### 1. 設定 PCR 機器

1 cycle 94°C for 2 min

35 cycles 94°C for 30 sec

65°C for 30 sec

72°C for 30 sec

cool down to 4 to 8 °C

### 2. 準備 PCR 反應試劑

每一PCR 反應體積為25 ul, 請依下表混合

Table 1: examples for pipetting schemes

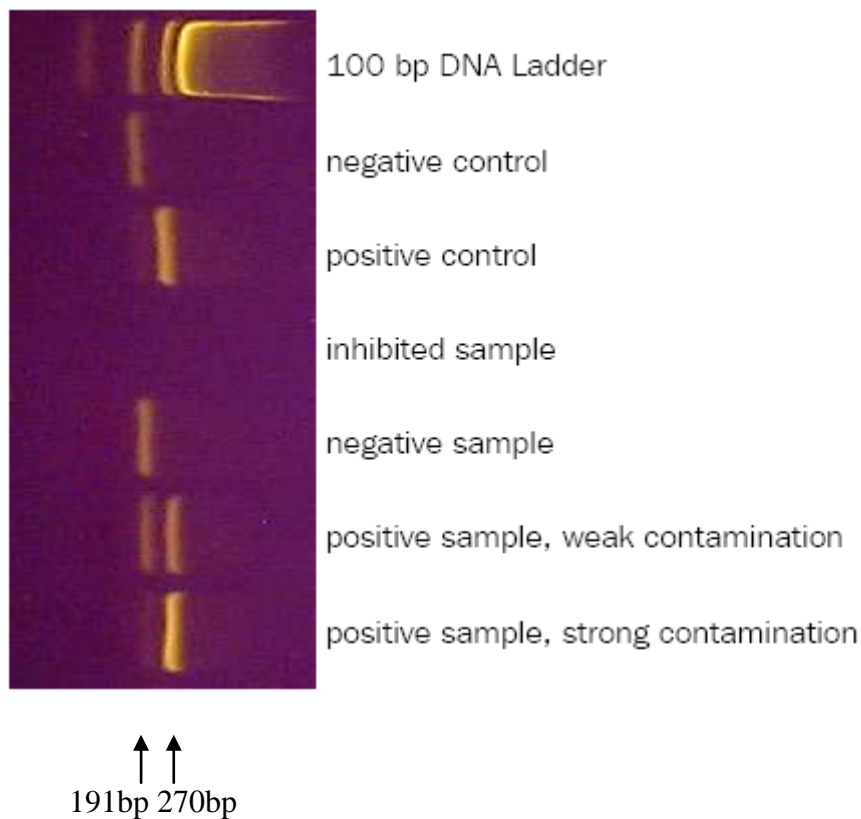
	For 1 reaction	For 5 reactions	For 25 reactions
Taq Pol. (5 U/μl)	0.2 μl	1.0 μl	5 μl
internal control (黃頭管)	2.5 μl	12.5 μl	62.5 μl
primer/nucleotide mix (紅頭管)	2.5 μl	12.5 μl	62.5 μl
10x reaction buffer (藍頭管，或Taq polymerase 廠商供應的 buffer)	2.5 μl	12.5 μl	62.5 μl
去離子水- DNA-free(白頭管)	15.3μl	76.5μl	382.5μl

混好 PCR 反應液(可保存於-18°C, 3個月), 最後每一管23ul 加上 2 μl DNA 檢體(前面描述的懸浮液製備), 混合, 離心 5 sec 後放入PCR 機器進行 PCR 反應。positive control為加入2 μl 的DNA template(綠頭管), negative control為加入2 μl 的水。為避免positive control及 negative control 污染, 請每次取樣後蓋緊瓶蓋。

### 3. 判定結果

- 甲、準備 1.5% agarose gel, 1 x TAE 或 1 x TBE buffer 均可.
- 乙、取 5ul 完成 PCR 的反應液與 1ul, 6 x loading dye混合, 放入 agarose well 中.
- 丙、將 gel 放入 Mupid 電泳槽, 以100V 跑 20-30 分鐘
- 丁、Ethidium Bromide (10mg/ml) 染色 10分鐘, 以VL Bio-print 或類似機種照相.
- 戊、判讀如下

Band pattern	判讀
191bp 的 PCR 產物	無 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 感染
267bp(270bp) 及 191bp 的 PCR 產物	輕微 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 感染
很明顯的 267bp(270bp) PCR 產物	高度 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 感染
無PCR 產物	PCR 失敗



#### 4. PCR 失敗原因:

常見原因有:

1. Taq Polymerase 活性不足或遭DNA檢體抑制。
2. Control DNA 管沒有在加水之前先離心。
3. PCR機器程式錯誤。
4. 設置PCR反應時，分注錯誤。

### 附錄:

#### 1. 各種黴漿菌株於本試劑之PCR 產物之長度

No.	species	amplicon size (bp)	No.	species	amplicon size (bp)
1	<i>Mycoplasma orale</i>	266	15	<i>Mycoplasma primatum</i>	267
2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	273	16	<i>Mycoplasma maculosum</i>	267
3	<i>Mycoplasma penetrans</i>	274	17	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
4	<i>Mycoplasma pirum</i>	274	18	<i>Mycoplasma cloacale</i>	266
5	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	273	19	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	265
6	<i>Mycoplasma fermentans</i>	267	20	<i>Mycoplasma synoviae</i>	266

7	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	273	21	<i>Mycoplasma salivarium</i>	266
8	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	268	22	<i>Mycoplasma faucium</i>	265
9	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	268	23	<i>Mycoplasma hominis</i>	266
10	<i>Mycoplasma falconis</i>	267	24	<i>Mycoplasma genitalium</i>	273
11	<i>Mycoplasma arthritis</i>	267	25	<i>Mycoplasma bovis</i>	267
12	<i>Mycoplasma arginini</i>	267	26	<i>Mycoplasma sp. ovine/caprine</i>	267
13	<i>Mycoplasma spermophilum</i>	267	27	<i>Mycoplasma agalactica</i>	267
14	<i>Mycoplasma opalescens</i>	266	28	<i>Mycoplasma timone</i>	266

## 圖解流程

