

天
净
沙
系
列

CAT#:13-74000(原 180804-50)
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

支原体（霉形体）污染 PCR 检测试剂盒

Mycoplasma Contamination PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>支原体 (Mycoplasma) 和亲缘关系很近的无胆甾原体 (Acholeplasma)、螺旋体 (Spiroplasma) 统称霉形体 (mollicutes)。霉形体是目前发现的最小的、最简单的原核生物。它们缺乏细胞壁、有变形能力、能通过滤菌器、可在无生命培养基中生长繁殖, 成为细胞培养中常见的一种污染源, 严重影响细胞生长率、细胞形态、基因表达、细胞代谢和细胞活力。因此, 对以支原体为主的霉形体进行早期检测非常重要, 它能使得研究人员在污染扩散前快速采取有效措施, 减低损失。本试剂盒是根据 PCR 原理开发, 具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 免 DNA 制备, 直接用裂解液做 PCR, 更加简单快捷。 2. 覆盖广, 根据 16S rDNA 保守区设计引物, 能检测 40 余种霉形体 (包括欧盟药典要求检测的 9 种支原体)。 3. 特异性高, 跟梭状芽孢杆菌、链球菌和乳酸杆菌等亲缘关系相近的微生物无交叉反应。 4. 灵敏高, 可检测低至几个拷贝/反应的支原体污染。 5. 提供内参和无感染性的支原体阳性对照 (DNA 片段), 能有效避免实验结果的假阳性和假阴性。 6. 可用于培养细胞、疫苗、血清、重组蛋白和耗材的污染检测。但不能用于临床诊断。 7. 本产品足够至少 50 次 40 μL 体系 PCR 检测(含阳性对照和阴性对照反应)。 																								
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="497 1043 1321 1473"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>支原体 DNAout</td> <td>13-74000a</td> <td>30 mL</td> </tr> <tr> <td>支原体内参</td> <td>13-74000ic</td> <td>100 μL (紫盖)</td> </tr> <tr> <td>支原体阳性对照</td> <td>13-74000pc</td> <td>50 μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>2\timesPCR MagicMix</td> <td>90805</td> <td>1 mL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>支原体通用引物</td> <td>13-74000yw</td> <td>100 μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>13-74000sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成 份	编 号	十孔盒包装	支原体 DNAout	13-74000a	30 mL	支原体内参	13-74000ic	100 μ L (紫盖)	支原体阳性对照	13-74000pc	50 μ L (红盖)	2 \times PCR MagicMix	90805	1 mL (黄盖)	支原体通用引物	13-74000yw	100 μ L (白盖)	使用手册	13-74000sc	1 份
成 份	编 号	十孔盒包装																							
支原体 DNAout	13-74000a	30 mL																							
支原体内参	13-74000ic	100 μ L (紫盖)																							
支原体阳性对照	13-74000pc	50 μ L (红盖)																							
2 \times PCR MagicMix	90805	1 mL (黄盖)																							
支原体通用引物	13-74000yw	100 μ L (白盖)																							
使用手册	13-74000sc	1 份																							
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输、-20$^{\circ}$C 保存, 有效期一年。</p>																								
<p>自备试剂</p>	<p>培养细胞样品、超纯水。</p>																								
<p>使用方法</p>	<p>一、样品的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 N 个样品管 (对 N 个样品而言) 和 1 个 NC (阴性对照) 管和 1 个 PC 管 (阳性对照)。在 NC 和 PC 管中各加入 200μL 不含支原体的培养基、疫苗、血清、血浆等阴性样品 (如果样品是培养细胞则用无支原体培养基, 如果样品是疫苗则用无支原体的疫苗, 以此类推)。如果没有无支原体的阴性样品, 则用超纯水替代。在 PC 管中加入 10μL 支原体阳性对照, 震荡混匀。放冰上待用。 2. 采集样品。如果待测样品是贴壁细胞, 则培养 3 天直到汇合度达到 70-90%后取 250μL 细胞培养物上清到 1.5 mL 离心管内。如果待测样品是悬浮培养的细胞, 则需要在换液 																								

传代后让细胞生长 3 天，取 250 μ L 细胞培养物上清到 1.5 mL 离心管内。培养时间太长容易累积过多的 PCR 抑制物，干扰检测。如果是疫苗、血清、血浆或其他溶液样品，则直接取 250 μ L 细胞培养物上清到 1.5 mL 离心管内。如果是实验耗材等，用超纯水洗涤后把洗涤液当成样品，取 250 μ L 细胞培养物上清到 1.5 mL 离心管内。

3. 在普通台式离心机上 1200 rpm 离心 5 min。该离心力下，哺乳动物细胞和其他大的组织碎片、沉淀物将被沉淀下，支原体将留在上清中。
4. 转移 200 μ L 上清到第 1 步标记的 N 个离心管中，然后和对照一起按下列两种方法之一制备 PCR 模板。
5. 方法一是加热法。将 200 μ L 样品在 95 $^{\circ}$ C 处理 5 分钟后放冰上，加入 2 μ L 支原体内参，震荡混匀此为 PCR 模板原液。首次试验时不知道样品中抑制物对 PCR 的影响程度，可以将 PCR 模板原液用水做 2 个 10 倍的梯度稀释，最后得到原液，10 倍和 100 倍 PCR 模板稀释液。之后的实验就可以根据首次实验的结果在此步直接将模板原液稀释到可以成功进行 PCR 的稀释度。加热法快速但灵敏度较低，如果需要更高的灵敏度，则可以选择方法二 (DNA 提取法)。其步骤是在 200 μ L 样品中各加入 600 μ L 支原体 DNAout (在 10 $^{\circ}$ C 以下会形成结晶，需要 60 $^{\circ}$ C 彻底融化并摇晃均匀后取用) 和 2 μ L 支原体内参 (只能在加入支原体 DNAout 之后加)，混匀后室温静置 10 分钟，加入 0.7mL 自备异丙醇，颠倒混匀后 15,000 g 室温离心 15 分钟，小心移弃上清。注意不要触及离心面管底的核酸沉淀。再加入 1.0 mL 70%乙醇，振荡数秒后 15,000 g 室温离心 3 分钟，小心移弃上清，短暂离心数秒后移弃残留上清。室温放 1 分钟后立即加入 200 μ L 自备超纯水重悬沉淀，此即为 PCR 模板。
6. 制备的样品如果不立即使用，则可以在 2-8 $^{\circ}$ C 放置至少一周，也可以在 -20 $^{\circ}$ C 保存一个月，也可以在 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。

二、设置 PCR 反应 (40 μ L 体系)

7. 如果待测样品数为 N，则需要设置 N+2 个 PCR 反应，PCR 反应设置如下：

成 份	样品管	NC 管	PC 管
2 \times PCR MagicMix	20 μ L	20 μ L	20 μ L
支原体通用引物	2 μ L	2 μ L	2 μ L
样品 PCR 模板 (原液或稀释液)	18 μ L	-	-
NC PCR 模板	-	18 μ L	-
PC PCR 模板	-	-	18 μ L

8. 轻柔混匀后上机，按如下参数进行 touch-down PCR：预变性 94 $^{\circ}$ C 90 秒，扩增 40 次循环 (94 $^{\circ}$ C 30 秒，touchdown 复性 45 秒，72 $^{\circ}$ C 45 秒。Touchdown 复性是从 70 $^{\circ}$ C 开始，每两次循环降低 1 $^{\circ}$ C，直到 20 次循环后降低到 60 $^{\circ}$ C，剩下 20 个循环复性温度

将保持在 60℃，直到 PCR 结束)，最后延伸性 72℃4 分钟。

三、结果分析

9. 取 20μL PCR 产物进行 1.5%的琼脂糖电泳。本试剂盒提供的 PCR mix 可以直接上样，不需另加上样缓冲液。支原体内参的 PCR 产物长度为 600bp，支原体阳性对照和污染支原体的 PCR 产物长度为 450bp 片段左右(根据支原体种类不同,长度在 430-470 bp 之间波动，下同)。

10. 预期结果

NC 样品：应该出现 600 bp 内参片段而无 450bp 左右的支原体片段。如果后者出现则说明实验室或所用试剂有支原体或支原体 PCR 产物的污染，本次实验无效，必须排查污染源后再重复实验。

PC 样品：应该同时出现 600bp 内参片段和 450bp 左右的支原体片段。如果缺失任何一个片段，则本次实验无效，请跟厂家联系。

在 PC 和 NC 都有效的前提下，才有必要对样品的 PCR 结果进行分析。样品有 4 种可能结果，其各自所对应的结论见下表：

可能结果	600bp 内参片段	450bp 左右 支原体片段	说明
支原体重度污染	无	有	内参被竞争性抑制
支原体轻度污染	有	有	
没有可检测支原体污染	有	无	
模板有 PCR 抑制物	无	无	需稀释模板后再测

11. 如果样品有支原体污染，要确认具体是哪一种支原体，可从本公司定做种支原体专一性 PCR。

附录：欧盟药典要求对生物和细胞制品进行支原体污染检测的 9 种支原体名录

学名 (按字母顺序排列)	中文名	污染占比
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	莱氏无胆甾原体	5%
<i>Mycoplasma arginini</i>	精氨酸支原体	21%
<i>Mycoplasma fermentans</i>	发酵支原体	13%
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	鸡败血症支原体	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	猪鼻支原体	26%
<i>Mycoplasma orale</i>	口腔支原体	34%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	肺炎支原体	
<i>Mycoplasma synoviae</i>	滑液支原体	
<i>Spiroplasma citri</i>	柑橘僵化螺原体	

关联产品

免提支原体污染 LAMP 检测试剂盒