

Quick Cell PCR 法支原体检测试剂盒

产品描述

QuickCell PCR 法支原体检测试剂盒，本试剂盒采用一对支原体特异性引物，用于对样品的支原体基因组 DNA 进行 PCR 扩增，然后通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。试剂盒内同时含有内参对照，用于监控 PCR 是否正常扩增。

本试剂盒是一种广谱的支原体检测试剂盒，可以识别所有 100 多种至今已发现的支原体；能用于检测一切可能含支原体的样品，比如：体外细胞培养的上清；血清；各种体液，如唾液、尿液、鼻腔分泌物等；其他液体样品等。具有 100%支原体识别率、灵敏度极高、含内参条带从而可以区分真阴性样品和假阴性样品、无需配套相对昂贵的荧光定量 PCR 仪等优点。

经多次测试，本试剂盒有记录可以识别在体外细胞培养中曾经报道出现的 20 种支原体，根据文献报道，这些支原体基本能占污染细胞的支原体种类的 100%。具体如下：(1) M.hyorhinis、(2) M.fermentans、(3) M.arginini、(4) M.hominis、(5) M. orale、(6) M.salivarium、(7) M.pirum、(8) A.laidlawii、(9) M.agalactiae、(10) M.bovis、(11) M.bovoculi、(12) A.axanthum、(13) M.buccale、(14) M.pneumoniae、(15) M.arthritis、(16) M.pulmonis、(17) M.gallisepticum、(18) M.gallinarum、(19) M.canis、(20) Ureaplasmaurealyticum（注：M.为 Mycoplasma 的缩写；A.为 Acholeplasma 的缩写）。

订购信息

产品名称	货号	规格
Quick Cell PCR 法支原体检测试剂盒	91-05-0019	100T

产品组分

产品组成	规格
支原体引物和内参（100 次）	206 μL
阳性支原体 DNA	50 μL
去离子水	1.8 mL （请使用普通蒸馏水或去离子水， 不能使用去内毒素的水）

【注】：以下试剂需要自行准备：①普通 Taq DNA 聚合酶（推荐使用 Takara 品牌的 ExTaq Hot Start version，货号：RR006A，已包含 2.5mM 的 dNTP）和相应的缓冲液；②2.5mM 的 dNTP；③DNA 上样缓冲液。

运输与保存

蓝冰运输。-20℃保存，有效期 60 个月。

使用方法

1.待测样品的准备

取换液后培养 2-3 d 且汇合度在 90%左右的细胞培养液上清（贴壁细胞）。悬浮培养的细胞在换液传代后，生长 2-3 d 再取培养液进行检测。可以按照以下两种方法之一进行样品的前处理：方法一：

- (1) 取 150 μL 上述待测样品到 1.5 mL 离心管内，在普通台式离心机上 1000 rpm 低速离心 5 min；
- (2) 上述离心上清液，95℃ 加热处理 5 min（可以转移到 PCR 管内，在 PCR 仪上进行加热处理），简单离心（1000g，5 s）后，取上清进行检测。

方法二（推荐本方法，有高速离心机的可选用本方法，可以去 PCR 抑制物，准确性更高。）

(1) 根据浓缩倍数，可以取 100 - 1500 μ L 上述待测样品到 1.5 mL 离心管内，普通台式离心机 1000 rpm 离心 5 min，将离心后的上清转移到另一个离心管内，丢弃细胞沉淀。

(2) 将上清继续 13000rpm（约 16000g）高速离心 5min，小心吸走全部上清，用 50 μ L 5mM Tris-HCl, pH8.5（推荐使用，样品可以长期保存）或者去离子水（样品比较不稳定，只适合当天或短期内检测使用）重悬、沉淀（沉淀中含有支原体），吹吸均匀。

(3) 该重悬后的样品可以直接检测，也可以进行热处理后再检测（热处理后，样品保存更稳定）。热处理具体如下：95 $^{\circ}$ C 加热处理 5 min（可以转移到 PCR 管内，在 PCR 仪上进行加热处理），简单离心（1000g，5 s）后，取上清进行检测。

【注】：

这里的细胞培养上清不是指细胞经胰酶消化后的离心上清，而是指至少培养 2 d 后的贴壁细胞培养液上清或悬浮细胞培养液；

本步骤的低速离心是为了去除哺乳动物细胞，以排除其不必要的干扰。所以离心力要严格控制在 150-200g，该离心力下，哺乳动物细胞将被沉淀下来而支原体不会；

收集的待测细胞培养液样品如果不立即检测，请放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冰箱保存；

如果预期待测样品支原体含量较少（比如低温保存的血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液、生物制品、极个别细胞培养上清等），可以采取提高检测的灵敏度，具体方法请看后文注意事项部分：如何提高本试剂盒检测灵敏度。

2.PCR 体系的配制

(1) 按照 25 μ L 体系配制比例如下。如果是多样品检测，加两个对照样品后各组分总体积如下表。配制好的混合液，按每管 23 μ L 分装到 0.2 mL 的 PCR 管中。

	单个样品体积(μ L)	样品总数	总体积(μ L)
去离子水	16.375	N	16.375X(N+2)X1.06
10 $\times$ Ex Taq buffer (含 Mg ²⁺)	2.5	N	2.5X(N+2)X1.06
2.5 mM dNTP	2	N	2X(N+2)X1.06
5 Units/ μ L Ex Taq Hot Start	0.125	N	0.125X(N+2)X1.06
支原体引物和内参	2	N	2X(N+2)X1.06

【注】：

- ① 总体积中多配制 **6%** 是为了防止移液导致误差，以保证每个反应管中的反应液足量；
- ② 如果有条件，**PCR** 体系的配制最好在冰上进行操作；
- ③ 本试剂盒不推荐使用 **2X** 的 **PCR mixture**（内含 **Taq** 酶、缓冲液和 **dNTP**），建议使用 **Taq** 酶、**10 $\times$ Taq** 缓冲液和 **dNTP** 等试剂配制 **PCR** 体系；
- ④ 为了避免可能的污染，收到的支原体引物和内参，可以适当分装（比如：每支 **40 μ L**）后冷冻保存；
- ⑤ 如果使用的是其他 **Taq** 酶（前提是：阴性对照的 **586bp** 内参条带必须有一定亮度，且稳定性良好，否则不能使用），酶、去离子水的加入量需要根据其说明书进行调整。

(2) 加入待测样品、阴性和阳性对照样品。样品检测管中加入 2 μ L 待测样品，阴性对照管加入 2 μ L 去离子水，阳性对照管加入 2 μ L 阳性支原体 DNA。

【注】：

- ① 装有阳性支原体 **DNA** 的螺口管开盖之前，低速离心或用手指捏住，用力甩一下即可；

② 进行反应体系配制的房间，与样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间最好分开。

3.PCR 参数设置

1 cycle	94 °C	2 min
40 cycles	94 °C	15 sec
	55 °C	15 sec
	72 °C	45 sec
1 cycle	72 °C	5 min
1 cycle	8 °C	forever

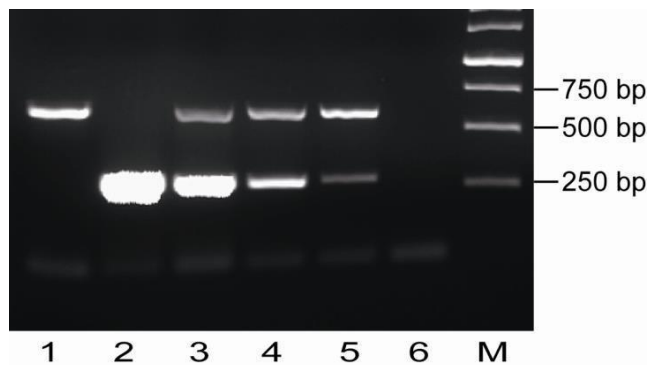
4.PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

配制含溴化乙锭（EB）的浓度为 1.5%的 DNA 琼脂糖凝胶；当溴酚蓝染料跑出上样孔 3-4cm 时，停止电泳，拍照。

结果判断

PCR 扩增的结果有可能出现以下几种情况：

	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	DNA Mark
586 bp 内参条带	++	-	+	++	++	-	
270 bp 左右条带	-	++++	+++	++	+	-	
结果图示(见图 1)	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6	泳道 M
支原体污染判断	阴性	极重度污染	重度污染	中度污染	轻度污染	PCR 被抑制	



【注】：“-”代表没有条带；“+”代表有条带；“+”号越多代表条带越强。

支原体 PCR 扩增结果：586 bp 条带为内参条带，270 bp 左右的条带为支原体特异条带（各支原体的条带大小会略有不同，总体在 266-280bp 之间。注意：支原体特异条带的大小不会超过该范围。超过该范围的，就是杂带！）。随着支原体 DNA 模板的增加，270bp 左右的条带会逐渐增强而 586bp 的内参条带会逐渐减弱，甚至消失。

泳道 1：阴性对照或者没有支原体污染的样品；

泳道 2：极重度支原体污染样品；

泳道 3：重度污染样品；

泳道 4：中度污染样品；

泳道 5：轻度污染样品；

泳道 6：PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制，导致扩增失败。

M：DNA marker.

注意事项

1. 本产品主要用于细胞上清支原体污染检测，仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 设有阴性对照，保证本试剂盒含有的支原体引物和内参以及整个反应体系正常。

3. 只有当阴性对照的结果没有出现 270 bp 左右的支原体特异条带时，其他样品的检测结果才是可信的。

4. 每次试验阴性对照中 586 bp 的内参条带都必须出现而且要有一定的亮度，才说明试验成功。

如果阴性对照的内参条带经常没有出现或者非常弱，说明试验不成功，这时可以采取以下几个措施：

a. 请使用普通蒸馏水或去离子水。不能使用去内毒素的水、DEPC 处理的水或者商品化的 DNase/RNase-free 的水，这几种水都可能会抑制 PCR 扩增的效率。 b. 请使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version（首选。货号：RR006A，可用 400 次）。 c. 可以尝试增加 PCR 的循环数，比如：由原来的 40 个循环，增加到 45 个循环。如果采取以上几个措施后，阴性对照的内参条带仍然经常没有出现或者非常弱，请联系厂家解决。

5. 如果直接使用细胞培养液上清进行检测，而检测结果显示该样品 586 bp 条带和 270 bp 左右的条带都没有出现（如图 1，泳道 6）或者内参条带非常微弱，在排除 PCR 试剂的问题后，说明该样品含有抑制 PCR 扩增的代谢产物。

6. 防 DNA 污染注意事项：a. 强烈建议所有操作全部使用进口滤芯吸头（比如：Axygen 滤芯吸头）进行操作，以免试剂被污染。 b. “PCR 体系配制的房间、移液枪”（不要使用细胞培养室的移液枪！）和“PCR 产物的电泳房间、移液枪”一定要分开，不能在同一个房间进行，也不能使用相同的移液枪进行操作。 c. PCR 产物是导致假阳性的最主要原因，PCR 产物不要在 PCR 体系配制的房间中打开。 d. 样品处理的房间和移液枪，如有条件，最好也分开。 e. 收到的支原体引物和内参，可以分装（比如 40 μ L 一支）后保存。

8. 支原体检测样品可以分成两类：第一类，用含血清的培养液培养的哺乳动物细胞上清液，由于该条件非常适合支原体生长，培养数天后，支原体密度一般较高，可达 10^7 - 9 /mL，可以直接测。

第二类，低温保存的血浆、血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液等样品，由于这些样品即使有支原体污染，支原体含量一般很少，直接使用快速支原体检测试剂盒进行检测，往往检

测不出来。这些样品建议：（1）对样品的支原体进行离心浓缩处理；（2）使用支原体液体培养基（必须同时接种不含精氨酸和含精氨酸的两种支原体液体培养基）培养 3-7 d 后，再进行检测。



xin3io

苏州欣协生物科技有限公司

电话：0512-63037851

网址：www.xinbiotech.cn

邮箱：info@szxxbio.com