



Quick Cell PCR 法支原体检测试剂盒

产品描述

Quick Cell 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. arthritidis*、(16) *M. pulmonis*、(17) *M. gallisepticum*、(18) *M. gallinarum*、(19) *M. canis*、(20) *Ureaplasma urealyticum* (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	AC16L064	100T

产品组分

组分	规格
A. 支原体引物和内参 (100 次)	206 μ L
B. 阳性支原体 DNA	50 μ L
C. 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普通的Taq DNA 聚合酶 (推荐使用 Takara 品牌的Ex Taq Hot Start version, 货号: RR006A, 已包含2.5 mM 的 dNTP) 和相应的缓冲液; ② 2.5 mM的dNTP; ③DNA上样缓冲液。

运输与保存

蓝冰运输。-20°C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 μ L 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 $^{\circ}$ 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。

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13000 rpm (约16000 g) 高速离心5 min, 小心吸走全部上清, 用50 μ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 (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: ①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;

②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 150-200 g, 该离心力下, 哺乳动物细胞将被沉淀下来而支原体不会;

③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;

④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	$16.375 \times (N+2) \times 1.06$
Takara 10 $\times$ Ex Taq buffer(含 Mg^{2+})	2.5	N	$2.5 \times (N+2) \times 1.06$
2.5 mM dNTP	2	N	$2 \times (N+2) \times 1.06$
Takara 5 Units/ μ L Ex Taq Hot Start	0.125	N	$0.125 \times (N+2) \times 1.06$
支原体引物和内参	2	N	$2 \times (N+2) \times 1.06$

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 2 $\times$ 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 586 bp 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

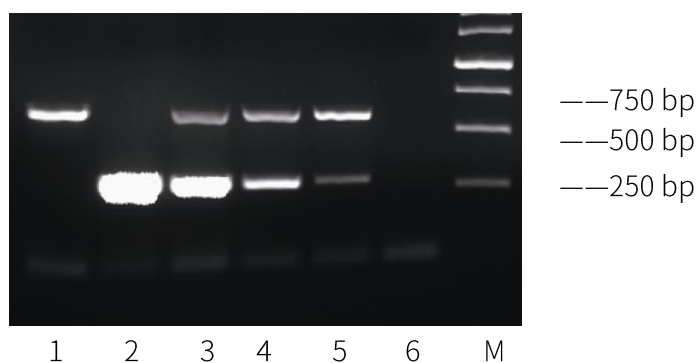
4.PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

配制含 GelRed 核酸染料 (10,000 × in water) (货号: AN34L022) 的浓度为1.5%的 DNA 琼脂糖凝胶；当溴酚蓝染料跑出上样孔 3-4 cm时，停止电泳，拍照。

5.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 266-280 bp 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，270 bp 左右的条带会逐渐增强而 586 bp 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. 可尝试增加 PCR 的循环数, 比如: 由原来的 40 个循环, 增加到 45 个循环。
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。
7. 如发现细胞被支原体污染, 推荐使用李记生物的 Quick Cell 支原体祛除预防试剂盒 (货号: AC16L066); 以及 EZ 水浴锅抑菌剂 (货号: AC16L162) 和 EZ 细胞房除菌剂 (货号: AC16L143)。产品详情可咨询销售人员或见官网: <http://life-ilab.com/>
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, 可以直接检测。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。具体方法请参考李记生物 Quick Cell 发光法支原体检测试剂盒 (货号: AC16L062) 说明书中最后的注意事项部分。该方法速度较慢, 需要 3-7 d, 但是可靠性高。

相关产品推荐

- EZ Trans 细胞转染试剂 (高效) (货号: AC04L092)
特级胎牛血清 (Foetal Bovine Serum) (货号: AC03L055)