

货号: MB019a-md-20

# miRbay™ 支原体 PCR 检测

## 说明书

成都诺恩生物科技有限公司

## 目录

一、简介 .....	3
二、取样方法.....	3
三、检测结果示例: .....	4

## 一、简介

支原体是实验室中常见的污染细胞的原核生物。其环状双链 DNA 中富含腺嘌呤和胸腺嘧啶，支原体含有特异性的 16S 和 23S 核糖体 RNA。因支原体属于直径介于 0.2-2 $\mu$ m 的最小原核生物，形态易变，故极易通过滤膜而逃过培养液的过滤除菌步骤。又因其缺少细胞壁，所以对某些常用抗生素具有抗性。在细胞培养液中，支原体可达到 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup>CFU/mL (CFU=Colony Forming Unit, 是一种支原体的浓度测量单位) 而不使培养液混浊及影响细胞生长。多种支原体对细胞不产生任何病变效应，使得细胞污染不易被察觉。

细胞培养（特别是传代细胞）被支原体污染是个世界性问题。在细胞培养中支原体感染发生率达到 63%，支原体感染发生后能改变细胞的 DNA, RNA 及蛋白表达。因此每一株外来细胞在进入实验室之前都应通过支原体检测，并且每个实验室都应对其培养中的细胞进行定期支原体检测。

诺恩生物科技有限公司采用自主研发的 mycobay<sup>TM</sup> 检测法可以通过单步 PCR 反应对支原体污染进行快速检测。实验时，把诺恩生物科技有限公司独创的特异性内参（10 个分子）和处理后的样本及 PCR 反应物预混合，并加入与内参及支原体 DNA 相对应的引物，在一个反应管同时扩增内参和支原体 DNA，最后进行琼脂糖凝胶电泳分析，对比内参产物和支原体 DNA 产物的凝胶条带亮度，对样本中的支原体污染进行检测（检测结果见图 2、图 3）。相对于传统的两步 PCR 法，mycobay<sup>TM</sup> 检测法有以下优点：

◎检测结果更客观——支原体 DNA 和内参在同一个 PCR 反应管中同时扩增，随后进行凝胶电泳分析，通过内参和待检测支原体的对比，确定细胞是否有支原体污染。当避免 PCR 失败造成的阴性检测结果被误认为是无支原体污染

◎高敏感度——可检测到样品中 1 个细胞的支原体污染。

◎高特异性——特异性的检测 7 种类型的支原体：M. hyorhinis, M. orale, M. arginini, M. fermentans, M. hominis, A. laidlawii, M. pneumoniae。

## 二、取样方法

取样方法一：

1. 将细胞在无抗生素的培养液中传代两次。
2. 接近长满并且 72h 之内没有换液的细胞培养物，在无菌条件下用 0.5ml 无菌 tube 管收集上清液 100-200ul 。
3. 用封口膜密封标记好之后试管盒，常温快递至成都市高新区科园南路 88 号 B6-501。

注：此方法可检测到样品中极其微量的支原体，精确到单个细胞的支原体污染，若只需做常规检测，可采用取样方法二。

**取样方法二：**

- 1、接近长满并且 48h 之内没有换液的细胞培养物，在无菌条件下用 0.5ml 无菌 tube 管收集上清液 100-200ul 。
- 2、用封口膜密封标记后放进试管盒，常温快递至四川省成都市高新区科园南路 88 号 B6-501。

**三、检测结果示例：**

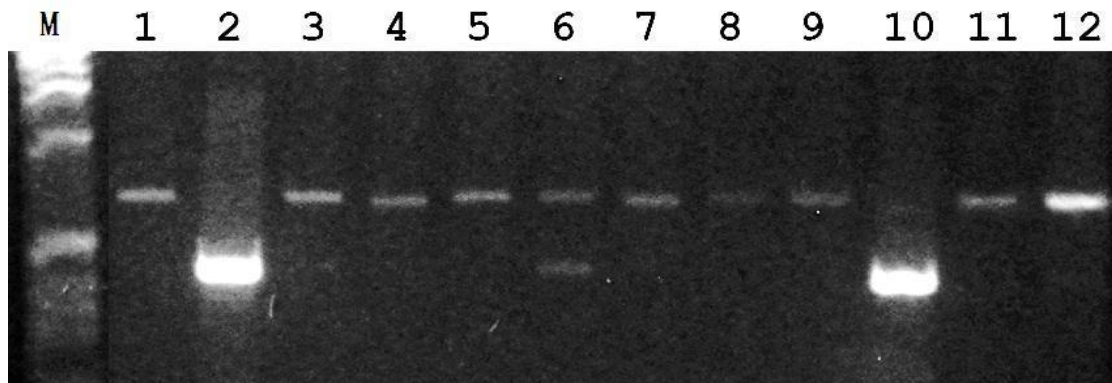


图 1：凝胶电泳图谱。其中：M 为 marker；700 bp 处为 PCR 内参产物；300 bp 左右为支原体 DNA 扩增产物，不同的支原体保守区片段长度不一，但产物都在 300bp 左右。泳道 1-12 在 700bp 处各有一条带，证明实验结果准确可靠。内参的加入量为 10 个分子，对比每个样本在 700bp 处的条带亮度和在 300bp 处的条带亮度，可以确定支原体 DNA 大于 10 个分子，或者小于等于 10 个分子，进而确定细胞有无支原体污染。例：泳道 6 在 700bp 的条带亮度和在 300bp 处的条带亮度基本相同，说明待检测样本中支原体 DNA 的分子数在 10 个左右。

	Sample Code	Cell Name	Note	Result
# 1	control	dd Water		----
# 2	JD-1	细胞 1	支原体污染	++++
# 3	JD-2	细胞 2	无支原体污染	----
# 4	JD-3	细胞 3	无支原体污染	----
# 5	JD-4	细胞 4	无支原体污染	----
# 6	JD-5	细胞 5	可能有轻度支原体污染，建议传代培养后重新采样检测	+
# 7	JD-6	细胞 6	无支原体污染	----
# 8	JD-7	只有培养基		----
# 9	QL-1	细胞 7	无支原体污染	----
# 10	QL-2	细胞 8	支原体污染	++++
# 11	QL-3	细胞 9	无支原体污染	----
# 12	QL-4	细胞 10	无支原体污染	----

图 2：检测结果报告汇总