



支原体 PCR 检测试剂盒

PCR Mycoplasma Test Kit 可用于各种生物材料(如细胞培养物、实验动物分泌物、动物血清等)支原体感染的检测。应用聚合酶链式反应技术(PCR)对支原体 16s-rRNA 基因保守区域的特异性片段进行扩增检测。该方法可以在数小时内得到结果,与传统的选择性培养基培养检测方法相比较,本方法更快速,灵敏度和特异性更高,不会出现由于培养法检测时大量培养支原体而可能带来的次级污染的问题。国内外研究表明,细胞培养的支原体污染中,有 98% 以上是由以下五种支原体引起的: *M. orale*、*M. arginini*、*M. hyorhinis* 和 *A. laidlawii*、*M. Fermentans*。本试剂盒能检测包括以上五种常见支原体在内的 40 种支原体。

注: 本试剂盒仅用于研究, 不能用于临床诊断。

【试剂盒组成】

| | |
|------------|------------------------|
| 1 PCR 反应液 | 400ul (20ul/次, 20 次反应) |
| 2 Taq 酶 | 20ul (1ul/次, 20 次反应) |
| 3 DNA 阳性对照 | 1 管 |
| 4 使用说明书 | 1 份 |

【原理】

PCR 检测试剂盒中含有 PCR 反应所需要各种试剂组分, 如: 引物、dNTPs、缓冲液、Taq 酶、稳定剂等。PCR 反应液中加入检测样品和 Taq 酶, 即可进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增产物经琼脂糖电泳染色判断, 阳性样本将在 290bp 处出现特异性条带。

【使用方法】

1 实验所需器材与试剂

1.1 器材

- 1) PCR 仪
- 2) PCR 反应管
- 3) 电泳仪及水平电泳槽
- 4) 高速离心机
- 5) 微量移液器及移液器吸头

1.2 试剂

- 1) 琼脂糖
- 2) EB (溴化乙锭)
- 3) 去离子水或双蒸水

2 实验操作步骤

注: 当细胞生长至 80-90% 时可以取样进行检测, 培养液中的青霉素和链霉素不会影响检测效果。

1. 收取待检样品(贴壁细胞: 细胞生长至 80% 左右即可, 送检细胞不能用消化液消化细胞, 可以使用细胞刮刀刮取细胞; 悬浮细胞: 细胞生长至 80% 左右即可), 取 150ul (约 $1\sim 3\times 10^5$ 细胞数) 至离心管, 沸水浴 10min。
2. 将煮沸过的细胞悬浮液 12000rpm 离心 2-5min。
3. 取上清 4ul 作为 PCR 反应模板。
4. 充分融化 PCR 反应液, 按下列表格配制反应混合液, 并以 21ul/管分装至 PCR 反应管中。

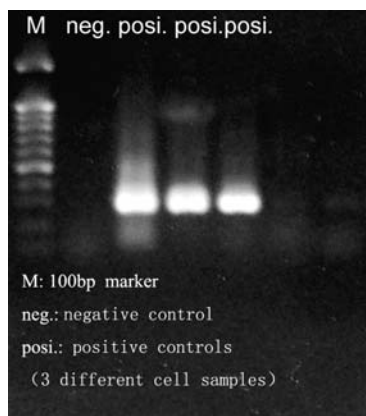
| | 1 个反应体系 | 5 个反应体系 | 20 个反应体系 |
|---------|---------|---------|----------|
| PCR 反应液 | 20ul | 100ul | 400ul |
| Taq 酶 | 1ul | 5ul | 20ul |

5. 每个 PCR 反应管中加入处理好的样品 4ul, DNA 阳性对照和阴性对照各加入 4ul/管。
6. 将所有 PCR 反应管放入 PCR 仪, 参照以下参数运行 PCR 仪。

| | | |
|-----|---------------|------------|
| 预变性 | 94℃ for 5min | |
| 循环 | 94℃ for 30sec | } 30cycles |
| | 56℃ for 30sec | |
| | 72℃ for 45sec | |
| 延伸 | 72℃ for 5min | |

7. 取 5ul PCR 扩增产物, 在 1%琼脂糖凝胶上直接点样 (注: 无需再加溴酚蓝, 扩增产物已包含溴酚蓝), 120V 电泳 20 分钟 (可根据电泳仪的情况, 适当调整参数)。
8. EB 染色观察。

电泳参考图:



- 【规格】 20 次/盒
- 【有效期】 自检定合格之日起有效期为 12 个月。
- 【贮藏】 避光, 保存于-20℃。

注意事项:

- 5.1 使用本试剂前请仔细阅读本说明书全文。
- 5.2 操作时应尽量少说话, 因口腔中也含有支原体, 可能引起样品污染, 而造成假阳性; 整个检测过程中, 反应体系的配制、样本处理及加样、PCR 扩增应分区域进行, 以避免交叉污染。
- 5.3 实验时, 试剂盒组分中的试剂使用前应充分融化并混匀 (混匀时禁止激烈振荡, 只需要进行上下倒置多次进行混匀)。
- 5.4 反应管中加好所有的试剂后, 应尽快上 PCR 仪进行扩增, 以免形成过多的二聚体。
- 5.5 细胞培养物中含有青霉素和链霉素等抗生物素不会影响本品的检测结果。如果用户需要进一步提高检测灵敏度, 建议细胞在不含青霉素和链霉素等抗生素中进行培养 2-3 天后送样检测。