支原体 PCR 检测试剂盒说明书

支原体污染是基础研究和工业生产中一个很常见的问题，可能有高达 87%的细胞系发生过支原体污染。支原体是一种直径约为 0.2~0.3 μm，无细胞壁的原核生物，可透过常见过滤膜（0.22-0.45μm），常规的无菌过滤方法不能将其去除，细胞培养常用的青霉素和链霉素也不能清除培养物中的支原体。支原体污染能耗尽营养物，促进代谢积累，导致 pH 改变，诱导或抑制细胞因子表达，并改变培养细胞的代谢、增殖特征及形态。支原体细胞体积小，种类繁多，培养物的混浊度以及对加富培养基的需求有限，此外，某些种类或菌株可能是细胞侵入性的，因此细胞被支原体污染一般难以察觉。由于支原体污染能影响几乎每一个细胞参数，所以很多研究都强调常规筛选研究细胞系的需要，以确保观察到的结果不被污染所损害。基于上述原因，开发一种针对支原体的快速可靠的检测方法颇具必要性。

我公司开发的支原体 PCR 检测试剂盒简化了测试过程，提高了检测效率，能在 2-3 小时内获得可靠的结果，是一种灵敏度高、特异性强、快速的检测细胞培养中支原体污染的方法。

本试剂盒特点：①特异性引物是针对高度保守的支原体 16S rRNA 序列设计的，可以用于检测非常广泛的支原体种类，不会受真核细胞或细菌 DNA 干扰。经本试剂盒测试的支原体菌株包括：猪鼻支原体（M. hyorhinis）、口腔支原体（M. orale）、肺炎支原体（M. pnemoniae）、精氨酸支原体（M. arginini）、发酵支原体（M. fermentans）、唾液支原体（M. salivarium）、无胆甾支原体（A. laidlawii），涵盖了所有常见的支原体污染种类；②采用降落 PCR（Touchdown PCR）法扩增 DNA 片段，只需进行一次 PCR 反应，同时又比普通 PCR 灵敏度更高；③采用的阳性对照样品可扩增产生大小为 643bp 的 DNA 片段，使用的引物与支原体检测相同，用于判断 PCR 反应条件是否适合，从而鉴别假阴性结果；④本试剂盒包括了 PCR 反应所需的所有成分：DNA 聚合酶，dNTPs，PCR 反应缓冲液，引物和阳性对照样品，您只需要添加模板和水就可以进行 PCR 反应。

货号：Myco-P-20 **规格：20 个反应**
货号：Myco-P-50 **规格：50 个反应**
货号：Myco-P-100 **规格：100 个反应**

试剂盒组份：

组份	成份	体积（微升）		
		Myco-P-20	**Myco-P-50**	**Myco-P-100**
组份 A（蓝色管）	Taq 酶，dNTPs，染料	250	625	1250
组份 B（绿色管）	上下游引物	50	125	250
组份 C（黄色管）	阳性对照样品	50	125	250
水（白色管）	无菌超纯水	250	625	1250

客户需自备：PCR 仪，PCR 管，移液枪，枪头，电泳槽，离心机, DNA 分子 marker 等
保存条件：保存于-20℃，避免反复冻融。没有反复冻融的情况下，保质期一年

操作步骤：

1：样品准备：取 1 毫升细胞培养上清（贴壁和悬浮细胞都可以,最好已培养 48 小时以上），在 16000g 离心 5 分钟，小心弃去上清，避免丢失沉淀（沉淀量有可能很少，目视看不到）。将沉淀用无菌 PBS 重悬，在 16000g 离心 5 分钟，同样小心弃去上清，如此反复洗三次。最后将获得的沉淀用 100 微升超纯水重悬，置于 100℃水浴中孵育 5 分钟。如此制备好

的样品可在 4℃保存 1 到 2 个月。

2：PCR 反应的准备：

各组份融化后先瞬时离心，然后轻弹混匀。按下表在已灭菌的 PCR 管中配制反应体系，每次实验需加一个阴性和一个阳性对照，测试反应管可以有多个。配制过程中应注意无菌，戴口罩，并注意避免操作产生的气溶胶造成样品间的交叉污染，推荐在有风压的设备如超净台或生物安全柜中进行操作。建议配制完毕后瞬时离心以使液体沉至管底。

体积（微升）	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管*
组份 A	12.5	12.5	12.5
组份 B	2.5	2.5	2.5
组份 C	-	2.5	2.5 / - *
水	10	7.5	5.5 / 8 *
测试样品	-	-	2
总体积	25	25	25

**测试反应管中加入组份 C 可以判别测试样品中是否含有 PCR 抑制物，同时也会降低检测灵敏度，建议每个测试样品平行做两管，一个加组份 C，一个不加。*

3：PCR 反应：

降落 PCR 法（Touchdown PCR）：94℃变性 2 分钟；首循环：94℃变性 30 秒，68℃退火 30 秒，72℃延伸 45 秒；从第二到八个循环开始，每循环退火温度下降 1℃，其余不变；从第九个循环开始，反应条件固定为：94℃变性 30 秒，60℃退火 30 秒，72℃延伸 45 秒，循环 32 次；循环结束后，在 72℃延伸 7 分钟，最后保持在 4℃。

4：琼脂糖凝胶电泳：

按常规方法准备好 2%琼脂糖凝胶，加入 EB 或 Gold-View 等用于显色。每份反应液取 8 微升，无须加入上样缓冲液，直接加入凝胶加样孔中，另留一孔加入 DNA 分子 marker（要求在 400-700bp 区间有显示条带），120 伏电泳约 30 分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在 643bp 处有一条带，阴性对照无条带，检测条带在 438-470bp 区间。

注意事项：

1：组份 A 中含有染料，染料的加入不影响 PCR 反应，反应产物可直接电泳，节省时间。

2：本试剂盒检测范围涵盖支原体所有种属，真核细胞和革兰氏阴性菌不会造成干扰，与支原体亲缘关系较近的革兰氏阳性菌在反应中的灵敏度较支原体低 1000-10000 倍。

3：本试剂盒适用于检测支原体感染，客户如需区分感染的种属，可将 PCR 产物切胶然后测序，进行序列比对即可知种属类型。

4：有时可直接用细胞培养上清进行 PCR 反应。培养上清中常含有高浓度的 PCR 抑制剂，可能导致假阴性结果，故不建议使用此法。有些 PCR 抑制剂用离心可以除去，若离心不能去除，则推荐抽提基因组 DNA 进行 PCR。而某些 PCR 抑制剂，如黑色素，通过抽提基因组 DNA 也不能去除，此时可以通过加入高浓度（如 2%）的 BSA（牛血清白蛋白）中和其抑制活性。

5：假阴性结果判断方法：在测试反应管中同时加入测试样品和阳性对照样品，观察对照条带是否出现。在阳性对照管出现对照条带的情况下，如果测试反应管对照条带和检测条带都没有出现，则可判断为 PCR 反应受到了抑制，即假阴性结果。阳性对照管如果没有出现对照条带，请检查 PCR 条件是否恰当，或者与技术支持联系。

6：每个测试样品建议做两个反应：一个与阳性对照样品共同反应，排除假阴性结果，另一个单独反应，可避免因加入阳性对照样品所致的灵敏度降低。如果测试样品中支原体含量很高，可能会抑制阳性对照条带的出现。

7：本试剂盒仅供科研使用。