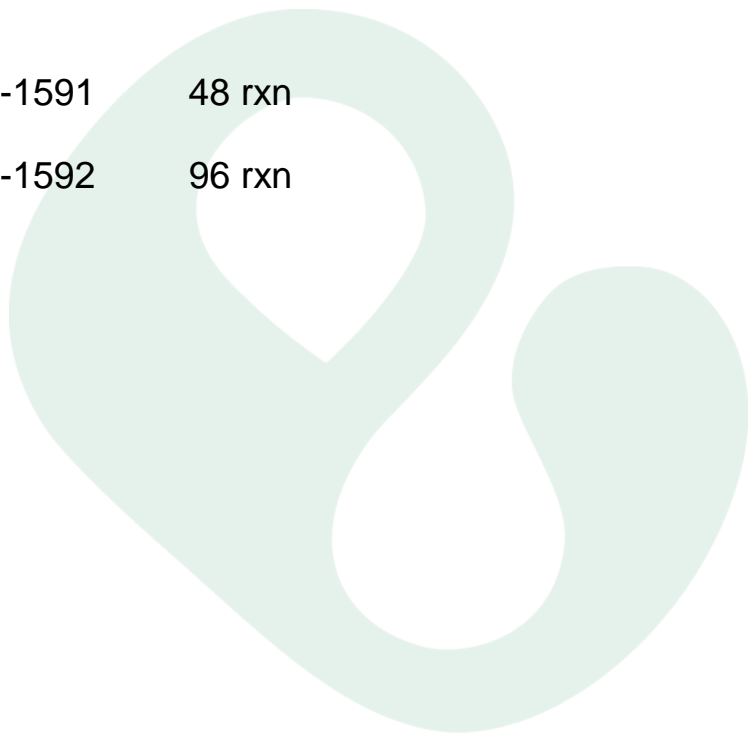


ExCell Bio

支原体检测试剂盒 with UDG PCR Mix and Loading Dye

User Manual

Catalog Number	MB000-1591	48 rxn
	MB000-1592	96 rxn



产品概述

支原体 (mycoplasma)：又称霉形体，为目前发现的最小的最简单的原核生物，估计有 15%~35% 的细胞被支原体污染。支原体污染会对细胞造成多方面的影响，包括代谢、免疫或生化特性、生长状况、以及细胞存活等多方面的改变，影响实验结果的稳定性、可靠性和准确性；支原体难以检测，同时也很难消除，其能轻易地通过 0.22 μ m 标准滤膜，同时也能拮抗绝大多数的抗生素，给细胞培养造成巨大损失。因此细胞都需要定期（如每 2~3 个月）进行支原体污染的检测。许多方法可用于检测支原体，包括肉汤或琼脂培养，直接或间接的荧光染色、ELISA、直接或间接的 PCR 法等，其中，直接 PCR 法灵敏度最高。

为保证 PCR 结果的准确性，要预防非特异性 PCR 扩增和污染，常用的措施是采用热启动 Taq 酶和 UDG (尿嘧啶-DNA 糖基化酶)。

化学修饰 Taq 酶活性中心被封闭，使得该酶在低温或常温没有活性，因此在加样至 PCR 扩增前，不会产生由于引物错误配对而形成的非特异性扩增。高温(如 95 $^{\circ}$ C)条件下，化学修饰基团会水解脱落，释放全部酶活性，从而实现 Taq 酶的热启动。最大程度降低非特异扩增和引物二聚体的形成，提高扩增灵敏度和特异性。

UDG (尿嘧啶-DNA 糖基化酶)能选择性水解断裂含有 dU 的单链或双链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成有缺失碱基的 DNA 链，在碱性条件及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。本产品选择 UDG 酶，最佳活性温度为 50 $^{\circ}$ C，95 $^{\circ}$ C 灭活。

本产品含有化学修饰热启动酶的 2xPCR mix，配以 dUTP 和 UDG 酶，可最大程度降低非特异扩增和引物二聚体的形成，有效防止 PCR 产物的交叉污染。同时在 PCR 管中预先加入上样 Loading Dye 成份，使 PCR 前加样处理及后续电泳上样变的更方便，以达到准确检测支原体污染，重复性好，可信度高。

产品应用

本试剂盒能检测支原体种类包括 M. Hyorhinis, M. Arginini, M.Orale, M. Fermentans, A. laidlawii 等常见支原体，这 5 种支原体代表了 98% 以上的细胞支原体污染。同时还能检测 Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma, Spiroplasma 等种属。

产品组分及储存条件

Components	MB000-1591	MB000-1592
8-cap strips with Loading Dye	6	12
Cell lysis buffer	5 ML	5 MLx2
Control template	50 μ L	50 μ L
2xEasyHotStart UDG PCR Master Mix	0.75 ML	1.5 ML
Sterial ddH ₂ O	1.5 ML	1.5 ML

保存条件: -20°C。

有效期: 一年。

运输条件: 干冰运输。

1 实验流程

一. 样品准备

在实验前几天, 细胞需在 **24 孔培养板**上, 用无抗生素的培养基进行培养, 待细胞生长至 **80%**以上开始试验。

A、样品为细胞 (优选方案)

- 1、弃去培养皿内的细胞培养基。
- 2、用 PBS 或者生理盐水洗 2 次细胞。
- 3、加入适量的裂解液 (以 **24 孔板为例, 每孔 100 μ L**) 裂解细胞, 室温放置 5 分钟。
- 4、收集细胞裂解液, 放入离心管中。
- 5、细胞裂解液 95°C处理 5 分钟。
- 6、13000rpm 离心 5 分钟, 上清转入一只新离心管。
- 7、取 2 μ L 上清作为模板进行 PCR 反应。

B、样品为培养上清 (替代方案)

- 1、取 1~1.5ML 细胞培养上清 (含有细胞或细胞碎片), 放入离心管中。
- 2、13000rpm 离心 5 分钟。
- 3、弃上清, 用 PBS 或者生理盐水洗**沉淀**一次。
- 4、加入 100 μ L 裂解液裂解细胞, 上下颠倒混匀后, 室温放置 5 分钟。
- 5、细胞裂解液 95°C处理 5 分钟。

6、13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一只新离心管。

8、取 2 μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

二 . PCR 反应及电泳

本试剂盒提供的 8 连管已预加入反应引物及 Loading Dyed 成份,使用前请先**短暂离心**后小心开启,以免飞扬丢失。请依次加入以下试剂(先加入 ddH₂O 以水化管中干粉,再加入样品,最后加入含酶 Mix) :

组分	样品	阳性对照	阴性对照
Sterial ddH ₂ O	10.5 μL	10.5 μL	12.5 μL
Sample	2 μL	/	/
Control template	/	2 μL	/
2xEasyHotStart UDG PCR Master Mix	12.5 μL	12.5 μL	12.5 μL

将 PCR 管**充分混匀**使反应液颜色均一,之后**短暂离心**,再置于热循环仪上按以下条件开始反应,推荐条件如下:

50°C 2 min (UDG 酶消化污染的 PCR 产物)

95°C 10 min (UDG 酶灭活、DNA 聚合酶激活)

95°C 30 sec	} 30 循环
56°C 30 sec	
72°C 30 sec	

72°C 5 min

取 5 μL 扩增产物直接电泳(产物中已含 Loading Dye,不用额外添加,建议使用 2%的琼脂糖凝胶电泳)

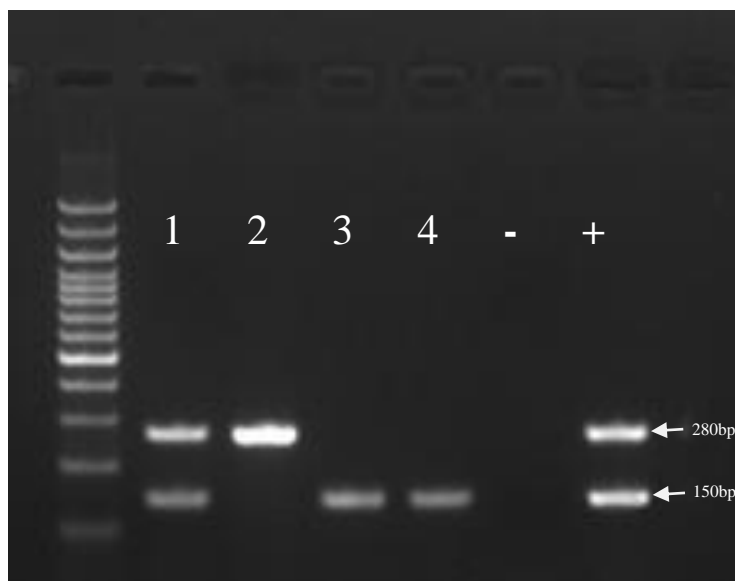
结果分析

在阴阳性对照成立的前提下,对样品结果进行判定

PCR 模板	PCR 产物	判定说明
阳性对照	有 280 bp 和 150 bp 条带	阳性成立
	无或只有一条带	阳性不成立
阴性对照	无条带	阴性成立
	一条或两条带	阴性不成立
样品	有 280 bp 和 150 bp 条带	支原体污染
	只有 280 bp 条带	支原体污染严重

	只有 150 bp 条带	无支原体污染
	无条带	无支原体污染（样品不含宿主 DNA） PCR 反应被抑制

如果细胞被污染，扩增产物将有 280bp 条带，宿主细胞 DNA 扩增产物为 150bp 条带；如果污染严重，280bp 条带会使 150bp 条带扩增减少；培养上清样本的 150bp 扩增量一般要少于细胞样本扩增量，更或者没有条带。150bp 宿主细胞 DNA 扩增引物适用于：人，大鼠，小鼠，兔，牛，猪，狗，猴，鸡等生物。



样品 1 和 2 为支原体检测阳性，其中样品 2 污染严重，样品 3 和 4 为支原体检测阴性。

100 bp DNA Ladder : 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp (加亮), 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1000bp, 1200bp, 1500bp, 2000bp

备注

本试剂盒能扩增的支原体种类如下：

编号	种类	
1	<i>A.laidlawii</i>	莱氏无胆甾原体
2	<i>A.granularum</i>	颗粒无胆甾原体
3	<i>Mesoplasma pleciae</i>	
4	<i>Mycoplasma arginini</i>	精氨酸支原体
5	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	猪滑液支原体
6	<i>Mycoplasma gateae</i>	猫支原体
7	<i>Mycoplasma faucium</i>	咽支原体
8	<i>Mycoplasma canadense</i>	加拿大支原体
9	<i>Mycoplasma buccale</i>	上颌支原体
10	<i>Mycoplasma orale</i>	口腔支原体
11	<i>Mycoplasma salivarium</i>	唾液支原体
12	<i>Mycoplasma auris</i>	耳支原体

13	<i>Mycoplasma cloacale</i>	泄殖腔支原体
14	<i>Mycoplasma anseris</i>	鹅支原体
15	<i>Mycoplasma phocicerebrale</i>	
16	<i>Mycoplasma falconis</i>	猎鹰支原体
17	<i>Mycoplasma spumans</i>	泡沫支原体
18	<i>Mycoplasma sphenisci</i>	
19	<i>Mycoplasma timone</i>	
20	<i>Mycoplasma subdolum</i>	疑误支原体
21	<i>Mycoplasma alkalescens</i>	产碱支原体
22	<i>Mycoplasma phocirhinis</i>	
23	<i>Mycoplasma maculosum</i>	斑状支原体
24	<i>Mycoplasma sp.</i>	
25	<i>Mycoplasma bovis</i>	牛支原体
26	<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	嗜精支原体
27	<i>Mycoplasma mustelae</i>	水貂支原体
28	<i>Mycoplasma caviae</i>	豚鼠支原体
29	<i>Mycoplasma columbinasale</i>	鸽鼻支原体
30	<i>Mycoplasma canis</i>	犬支原体
31	<i>Mycoplasma hyopharyngis</i>	猪喉支原体
32	<i>Mycoplasma fermentans</i>	发酵支原体
33	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	猪肺炎支原体
34	<i>Mycoplasma edwardii</i>	爱德华氏支原体
35	<i>Mycoplasma primateum</i>	类人猿支原体
36	<i>Mycoplasma opalescens</i>	乳白色支原体
37	<i>Mycoplasma zalophi</i>	
38	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	肺支原体
39	<i>Mycoplasma collis</i>	希尔氏支原体
40	<i>Mycoplasma mobile</i>	运动支原体
41	<i>Mycoplasma indienne</i>	印第支原体
42	<i>Mycoplasma verecundum</i>	不活泼支原体
43	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	猪鼻支原体
44	<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	吐绶鸡支原体
45	<i>Mycoplasma anatis</i>	鸭支原体
46	<i>Mycoplasma corogypsi</i>	黑秃鸨支原体
47	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	牛鼻支原体
48	<i>Mycoplasma alkalescens</i>	产碱支原体
49	<i>Mycoplasma penetrans</i>	穿透支原体
50	<i>Mycoplasma pirum</i>	梨支原体
51	<i>Mycoplasma genitalium</i>	生殖器支原体
52	<i>Mycoplasma arthritis</i>	关节炎支原体
53	<i>Mycoplasma hominis</i>	人型支原体
54	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	尿素分解尿素支原体