ExCell Bio
依科赛生物

ExCell Bio

支原体检测试剂盒

User Manual

Catalog Number	MB000-1391	48 rxn
	MB000-1392	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 0.22μm 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	MB000-1391	MB000-1392
8-cap strips	6	12
Control template	50ul	50ul
Cell lysis buffer	5ml	5ml×2

保存条件：-20℃。

有效期：一年。

运输条件：干冰运输。

实验流程

一．样品准备

在实验前几天，细胞需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

1、弃去培养瓶内的细胞培养基。

2、用 DPBS 洗 2 次细胞。

3、加如适量的裂解液（以 24 孔板为例，每孔 100ul）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 1~2ul 上清作为模板进行 PCR 反应。

B、 样品为培养上清

1、取 1~1.5ml 细胞培养上清，放入离心管中。

2、13000rpm 离心 5 分钟。

3、弃上清，用 DPBS 洗沉淀一次。

4、加入 100ul 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 1~2ul 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，使用前请先离心后小心开启，以免飞扬丢失。以 Taq 酶为例，推荐如下：

组分	样品	阳性对照	阴性对照
10×Buffer	2.5	2.5	2.5
dNTP（2.5mM）	1	1	1
Sample	1	3	0
Taq （5U/ul）	0.2	0.2	0.2
H2O	20.3	18.3	21.3

将 PCR 管内液体混匀离心后，置于热循环仪上按以下条件开始反应，推荐条件如下：

95℃ 30 sec

95℃ 30 sec

56℃ 30 sec } 30 循环

72℃ 30 sec

72℃ 5 min

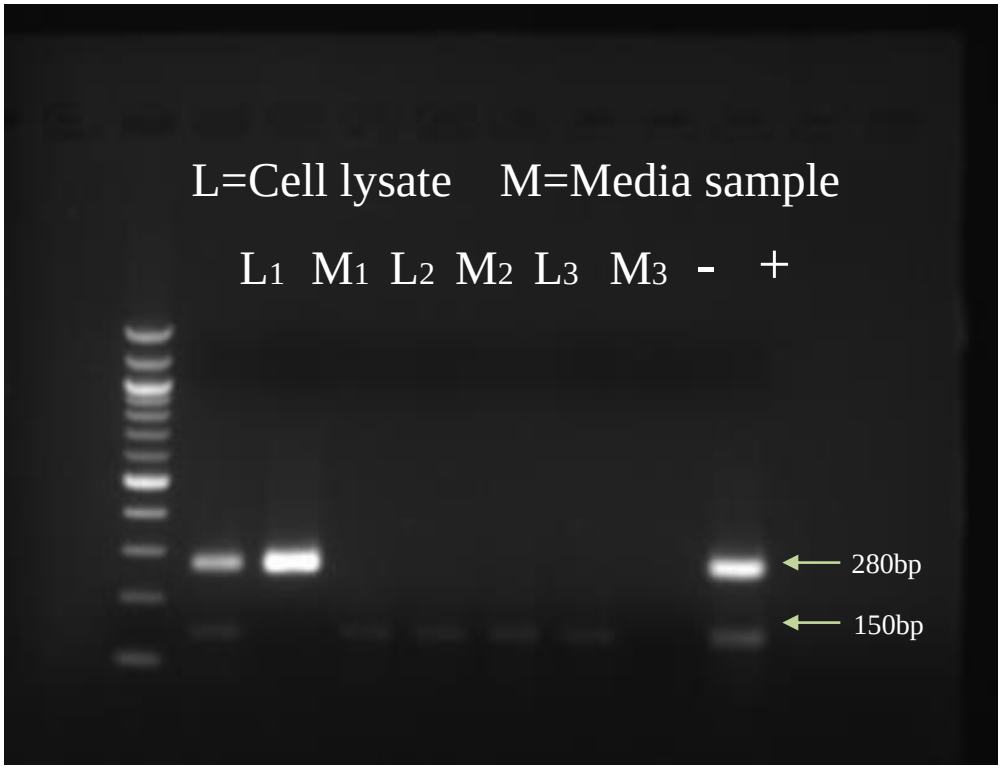
扩增产物电泳（建议使用 2%的琼脂糖凝胶电泳）

结果分析

在阴阳性对照成立的条件下，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 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 条带	支原体污染
	只有 280 bp 条带	支原体污染严重
	只有 150 条带	无支原体污染
	无条带	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。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 为支原体检测阳性，其中 M1 污染严重，样品 2 和 3 为支原体检测阴性。

NEB 100 bp DNA Ladder ：100bp，200bp，300bp，400bp，500bp（加亮），600bp，700bp，800bp，900bp，1000bp（加亮），1200bp，1517bp。

备注

本试剂盒能扩增的支原体种类如下：

编号	种 类	
1	A.laidlawii	莱氏无胆甾原体
2	A.granularum	颗粒无胆甾原体
3	Mesoplasma pleciae	
4	Mycoplasma arginini	精氨酸支原体
5	Mycoplasma hyosynoviae	猪滑液支原体
6	Mycoplasma gateae	猫支原体
7	Mycoplasma faucium	咽支原体
8	Mycoplasma canadense	加拿大支原体
9	Mycoplasma buccale	上颌支原体
10	Mycoplasma orale	口腔支原体
11	Mycoplasma salivarium	唾液支原体
12	Mycoplasma auris	耳支原体
13	Mycoplasma cloacale	泄殖腔支原体
14	Mycoplasma anseris	鹅支原体
15	Mycoplasma phocicerebrale	
16	Mycoplasma falconis	猎鹰支原体
17	Mycoplasma spumans	泡沫支原体
18	Mycoplasma sphenisci	
19	Mycoplasma timone	
20	Mycoplasma subdolum	疑误支原体
21	Mycoplasma alkalescens	产碱支原体
22	Mycoplasma phocirhinis	
23	Mycoplasma maculosum	斑状支原体
24	Mycoplasma sp.	
25	Mycoplasma bovis	牛支原体
26	Mycoplasma spermatophilum	嗜精支原体
27	Mycoplasma mustelae	水貂支原体
28	Mycoplasma caviae	豚鼠支原体
29	Mycoplasma columbinasale	鸽鼻支原体
30	Mycoplasma canis	犬支原体
31	Mycoplasma hyopharyngis	猪喉支原体
32	Mycoplasma fermentans	发酵支原体
33	Mycoplasma hyopneumoniae	猪肺炎支原体
34	Mycoplasma edwardii	爱德华氏支原体
35	Mycoplasma primatum	类人猿支原体
36	Mycoplasma opalescens	乳白色支原体
37	Mycoplasma zalophi	

38	Mycoplasma pulmonis	肺支原体
39	Mycoplasma collis	希尔氏支原体
40	Mycoplasma mobile	运动支原体
41	Mycoplasma indiense	印第支原体
42	Mycoplasma verecundum	不活泼支原体
43	Mycoplasma hyorhinis	猪鼻支原体
44	Mycoplasma gallopavonis	吐绶鸡支原体
45	Mycoplasma anatis	鸭支原体
46	Mycoplasma corogypsi	黑秃鹫支原体
47	Mycoplasma bovirhinis	牛鼻支原体
48	Mycoplasma alkalescens	产碱支原体
49	Mycoplasma penetrans	穿透支原体
50	Mycoplasma pirum	梨支原体
51	Mycoplasma genitalium	生殖器支原体
52	Mycoplasma arthritidis	关节炎支原体
53	Mycoplasma hominis	人型支原体
54	Ureaplasma urealyticum	尿素分解尿素支原体