

MycoScan Mycoplasma Detection Kit

支原体检测试剂盒 说明书

产品包装

规格: 50rxns

目录号: MT01A

组 分	体 积
MycoScan PCR Master Mix 2X	625 μ l
MycoScan Positive Control 1X	25 μ l

本产品蓝冰运输; -10°C to -30°C 避光保存。

产品介绍

支原体污染是细胞培养中常遇到的问题。支原体污染可以改变细胞的特性。例如部分支原体会快速消耗培养基中的精氨酸,与细胞竞争营养,从而使细胞的生长速度减慢或停止;同时支原体还可以改变细胞的酶谱、细胞膜成分,造成细胞染色体异常或细胞病理性改变等。上述情况会严重影响到使用这些细胞所做实验的结果,导致结论不可靠。

支原体检测方法包括培养法、荧光染色法、代谢产物检测法、PCR 法等。其中培养法检测需时 3 周以上,且有一些支原体不形成菌落,无法检测其存在与否;荧光染色法灵敏度低,且需要昂贵的荧光显微镜;代谢物检测法的灵敏度也不高,同时完全培养基中添加的血清在制备过程虽然滤去了支原体,但仍可能因残留的代谢物而产生假阳性,且该方法成本较高。上述方法都不太适合实验室对细胞进行常规的支原体检测。PCR 法只需普通的 PCR 仪和电泳仪,且对技术要求不高、耗时短、费用低,适合实验室在细胞培养过程中对支原体污染进行日常防控。

本产品采用 PCR 检测法,其原理是根据支原体的保守序列设计引物,进行 PCR 扩增,最后通过凝胶电泳检测特异性条带的有无。本产品可同时检测 40 多种支原体,其中包括了细胞培养过程中最常被感染的 8 个品种。检测下限低至 5 个拷贝(检测示例见图 1),准确率达 99%,3 小时即可获得检测结果,支原体阳性条带在 280bp 处。另:本产品中添加了内参样品,以排除 PCR 体系带来的干扰。内参条带在 70bp 处。

相关配套产品: 支原体去除试剂 MycoFree Mycoplasma Elimination Reagent (Cat No.: ME01A)

操作说明

1. 样品前处理:

细胞正常培养 2 天(3 天效果更佳)后,吸取 1ml 培养上清,3000rpm 离心 5min,使细胞碎片沉淀。收集 500 μ l 上清至一新的 1.5ml 离心管,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴 10min 以裂解支原体释放 DNA。冷却至室温以进行下一步骤。

2. PCR 反应:

1) 反应体系

2×PCR Mix	12.5 μl
步骤 1 收集的上清裂解液/阳性对照/阴性对照	样品 2.5 μl / 对照 1 μl
无菌水	至 25 μl

注: 整个检测体系中应加入阳性及阴性对照, 阳性对照随试剂盒附赠, 阴性对照建议使用新鲜的基础培养基或灭菌水。阳性对照上样 1 μl 即可。

2) 反应条件

94°C 2min	
94°C 30sec	} 35 cycles
55°C 15sec	
72°C 30sec	
72°C 5min	

3. 电泳检测

1. 5-2%琼脂糖电泳检测。当 280bp 及 70bp (弱带) 处均出现条带, 则为支原体阳性结果; 当仅 70bp 处出现弱带, 则为支原体阴性结果。

检测效果示例

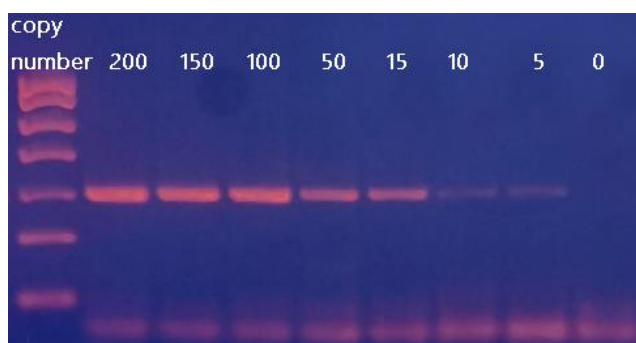


图 1: 支原体检测试剂盒灵敏度检测电泳图

注意事项

1. 检测样品应为正常培养 2-3 天后的细胞上清, 以确保痕量的支原体在培养过程中得到扩增。
2. 为防止出现假阳性或假阴性结果, 每次检测都应设置阳性及阴性对照。
3. 为保证检测效率, 防止细胞基因组 DNA 产生的杂带干扰, 建议进行样品前处理再进行 PCR 扩增。
4. 收集的培养上清可短暂保存在 4°C, 一周内检测不影响结果。煮沸后释放的支原体 DNA 因浓度低而不稳定容易降解, 易产生假阴性结果。因此, 经过前处理的样品应在当天完成检测。
5. 建议新引入的细胞系都进行支原体检测, 确保不污染实验室未受支原体感染或已去除感染的细胞。在养细胞每月检测一次并结合每周抽检, 做到有污染早发现。对于正在进行支原体去除处理的细胞建议每周必检, 直至出现阴性结果并至少维持一月, 后改为每月检测一次并结合每周抽检。

常见问题

1. 电泳后 280bp 处出现模糊的阴影带，怎么处理？

答：建议重新收取已正常培养 2-3 天的培养上清检测。

2. 为何电泳后出现梯状杂带，大小不在 280bp 处？

答：存在细胞基因组 DNA 的干扰，建议进行样品前处理之后重新扩增，以消除细胞基因组 DNA 的干扰。

3. 为何电泳后没有内参条带？

答：PCR 体系中 dNTP 的量是一定的，当扩增体系中支原体 DNA 的数量过大时，内参 DNA 的扩增效率会相对下降，甚至电泳后没有内参条带。

4. 为什么在光镜下看到黑色颗粒物，但 PCR 检测的结果却是阴性？

答：对于黑色颗粒物学术界尚无定论，有人认为是黑胶虫，或细胞碎片，甚至是无机物、真菌等等，所以出现黑色颗粒物并不代表细胞已受支原体感染。

5. 为什么用 PCR 法检测的结果与其它试剂盒的结果不一致？

答：因为检测的原理不一样，如有的检测试剂盒是检测支原体特异代谢物，虽然完全培养基中添加的血清在制备过程中可以滤去支原体，但其产生的代谢物仍可能残留，就会出现假阳性，产生不一致结果。



（官网）



（公众号）