

产品说明书

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia Inc.
9620 Medical Center Drive, Suite 101
Rockville, MD20850, USA
Tel: +1(301)762-0888;
Toll free: +1(866)360-9531
Fax: +1(301)762-3888
Web: www.genecopoeia.com

MycoGuard™ Mycoplasma PCR Detection Kit

产品货号: MP001

产品编号	产品内容	包装规格	储存条件
MP001-01	4×MycoGuard™ Master Mix	250 µL	-20°C 保存至少 12 个月
MP001-02	Ultrapure Water	1 mL	室温保存至少 12 个月
MP001-03	Positive Control	20 µL	-20°C 保存至少 12 个月

■ 产品简介

MycoGuard™ Mycoplasma PCR Detection Kit 是一种快速简便的支原体检测试剂盒。它以灵敏的 PCR 技术为基础, 含优化的 MycoGuard™ Master Mix、超纯水和阳性对照, 可应用于细胞培养过程及细胞培养相关试剂的支原体检测。

MycoGuard™ Master Mix 含有特定引物, 能特异扩增支原体基因组的 rDNA 保守序列, 可检测细胞培养过程中常见的多种支原体, 如 *M. arginini*、*M. arthritidis*、*M. bovis*、*M. hominis*、*M. fermentans*、*M. genitalium*、*M. hyorhinis*、*M. neurolyticum*、*M. orale*、*M. pirum*、*M. pneumoniae*、*M. pulmonis*、*M. salivarium* 和 *U. urealyticum*。受支原体污染的样品可通过 150~400 bp 的 PCR 扩增产物轻易识别。

■ 产品优势

- 简便 —— 取样后无需预处理细胞培养基; 反应体系配制简单
- 快速 —— 2 小时即可完成检测
- 灵敏 —— 培养基取样量低至 0.03 µL 即可有效检测支原体污染

■ 样品准备

进行细胞取样时, 样品不需要进行预处理。但为了获得更精确的检测结果, 待测样品的建议状态是 2 天或以上未更换培养基, 细胞融合率超过 80%。样品的准备可在室温条件下操作。

方案 1——快速取样操作

- 使用 PCR 管: 取 2-5 µL 细胞培养物, 以纯水稀释 20 倍。取 2-6 µL 稀释后的细胞培养物 (相当于 0.1-0.3 µL 原始培养物) 作为待检样品。
- 使用 1.5 mL 离心管: 转移 50 µL 细胞培养物至 1.5 mL 离心管, 盖紧离心管盖, 95°C 温育 5-10 min; 温育后, 以纯水稀释 20 倍, 20,000×g 离心 1 min 使变性蛋白沉淀。取 2~6 µL 上清液 (相当于 0.1-0.3 µL 原始培养物) 作为待检样品。

提醒:

- 如取样对象为悬浮细胞, 无需从培养基中去除细胞。
- 以 20 µL 体系进行 PCR 时, 建议样品 (PCR 模板) 不超过 1 µL。当样品浓度过高时, 培养基中的血清蛋白或其他组分将抑制 PCR 反应, 影响结果的准确性。
- 95°C 温育的待检样品可在 4°C 条件下储存 1~2 个月。

方案 2——浓缩细胞培养物中的支原体 DNA 为检测培养基中低浓度的支原体, 建议在 PCR 检测前按照以下方案浓缩培养基中的支原体 DNA:

- 转移 1 mL 培养基至 1.5 mL 离心管, 20,000×g 离心 5 min, 去除上清液;
- 以 1 mL PBS 重悬沉淀, 20,000×g 离心 5 min, 去除上清液;
- 至少以 PBS 洗涤沉淀 2 次, 去除上清液;
- 以 100 µL 纯水重悬沉淀;
- 盖紧离心管盖, 95°C 温育 5-10 min, 20,000×g 离心 1 min 使变性蛋白沉淀, 吸取上清液;
- 取 0.1-10 µL 上清液作为待检样品。

提醒:

- 无需从培养基中去除细胞或细胞碎片。
- 95 °C 温育的样品可在 4 °C 条件下储存 1-2 个月。

选择方案 3——分离细胞培养物中的支原体 DNA

如待检样品的细胞数量较少（可能为细胞生长已受支原体抑制），为精确获得检测结果，推荐使用以下方案：

1. 进行细胞计数后，取 10^4 - 10^5 细胞至 1.5 mL 离心管， $10,000\times g$ 离心 1 min，去除上清液；
2. 以 1mL PBS 重悬沉淀， $10,000\times g$ 离心 1 min，去除上清液；
3. 重复步骤 2；
4. 以 100 μ L 纯水重悬沉淀；
5. 盖紧离心管盖，95 °C 温育样品 5-10 min， $20,000\times g$ 离心 1 min，使变性蛋白沉淀，吸取上清液；
6. 取 0.1-10 μ L 上清液作为待检样品。

注意事项:

- 95 °C 温育的样品可在 4 °C 条件下储存 1-2 个月。

■ PCR 检测

1. 将 MycoGuard™ Master Mix 和 Positive Control 置于冰上使其完全融解，融解后轻柔混匀管内溶液；短暂离心使管壁溶液聚集到底部，置于冰上待用。
2. 按照下表，在冰上准备 PCR 反应液。**注意！检测中应同时设置阴性对照和阳性对照。**

反应液组份	阴性对照	阳性对照	待检样品
4×MycoGuard™ Master Mix	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Ultrapure Water	15 μ L	13 μ L	15 X μ L
Mycoplasma 或 Positive Control	-	2 μ L	X μ L
终体积	20 μ L	20 μ L	20 μ L

3. 轻柔混匀反应液，短暂离心使管壁溶液聚集到底部，按下表程序启动 PCR 反应：

循环数	步骤	温度	时间
1	预变性	94 °C	5 min
40	变性	94 °C	15 sec
	退火	50 °C	20 sec
	延伸	72 °C	20 sec
1	保温	72 °C	2 min

4. 取 2 μ L PCR 产物，以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

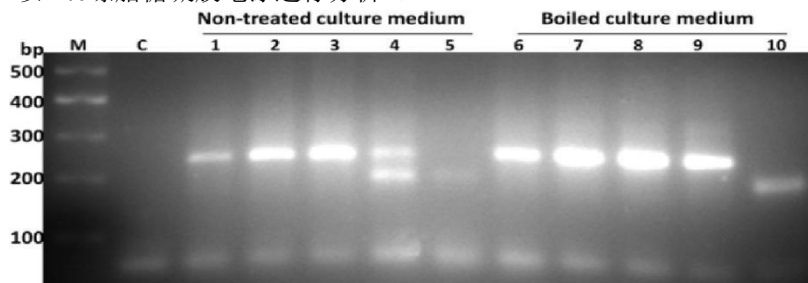


图 1. PCR 凝胶电泳分析示例

M: 100 bp DNA marker C: 阴性对照

1-5: 未处理的细胞培养基，PCR 模板量分别为 0.03、0.1、0.3、1.0 和 3.0 μ L

6-10: 煮沸的细胞培养基，PCR 模板量分别为 0.03、0.1、0.3、1.0 和 3.0 μ L

（注意：如图所示，5 和 10 由于样品添加量过高，细胞培养基中的血清蛋白和其他成分对 PCR 反应有抑制作用）

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。