

GENE
吉凯基因

MycoFree™支原体检测试剂盒说明书

上海吉凯基因化学技术有限公司
Shanghai Genechem Co.,Ltd.

MycoFree™支原体检测试剂盒说明书

*开始实验前请仔细阅读本说明书

■ 产品内容

Cat.No	产品名称	规格	储存温度
GCMF001A	MycoFree™支原体检测试剂盒	50 Rxns	-20 C
GCMF001B	MycoFree™支原体检测试剂盒	100 Rxns	-20 C

■ 产品描述

目前，检测支原体污染的方法有很多种，包括直接培养法、DNA荧光染色法、酶学检测法、探针法和PCR法等。其中，培养法需要的时间较长，敏感性较低，其敏感性依赖于培养基的成分和各成分含量；酶学检测法和探针法操作较为繁琐，涉及额外的细胞培养或特殊的仪器设备；DNA荧光染色检测法相对更简单，但容易出现假阳性结果。PCR检测法能特异性扩增支原体DNA，因高敏感性及简单快捷的特点简化了支原体污染的检测流程。

MycoFree™支原体检测试剂盒基于PCR法检测原理，可对细胞培养物和动物血清等多种生物材料进行支原体检测。该试剂盒中的Primer Mix是依据支原体基因组中高度保守的16SrRNA编码域而设计的，具有较高的检测灵敏性和特异性，且操作简单、快速，2小时内即可完成检测。

■ 产品组分

组分名称	组分说明	Cat.No/规格	
		GCMF001A	GCMF001B
PCR primer mix	PCR混合引物	60 μL	120 μL
Nuclease-free water	去核酸酶水	4×1 mL	4×1 mL
2x High-Fidelity polymerase mix	2x高保真聚合酶预混液	625 μL	1.25 mL
Positive control	支原体阳参 (1E+7 copies/2.5 μL)	100 μL	200 μL
Negative control	支原体阴参	100 μL	200 μL

■ 运输与储存方法

冰袋运输，收到产品后，请立即放-20 C冰箱低温保存。

■ 保质期

1年。

更多信息请登录吉凯基因官网，或致电来函吉凯基因。

■ 检测流程

1. 待检细胞样品准备

- (1) 将待检细胞换成无抗生素的完全培养基，至少培养3天且融合度达70%~90%。
- (2) 贴壁细胞收集400~500 μ L上清液，悬浮细胞混合后收集500 μ L细胞混悬液至无菌EP管中，1300 rpm离心5min（大约200~300g），取离心后的上清400 μ L用于支原体检测，丢弃下层剩余的100 μ L（含细胞沉淀）。
- (3) 取一块96孔培养板，上清分别加100 μ L至3个孔中，放入培养箱，继续培养3天以上，剩余100 μ L保存以做复检。
- (4) 将待检测样品转移到EP管中，95 $^{\circ}$ C沸水浴中煮5min（若当日不进行检测，样品先置于-80 $^{\circ}$ C保存，次日再煮沸）。

2. 细胞房或洁净室的消毒准备

- (1) 用75%酒精喷洒所有实验器材和物料表面，用棉球擦净。
- (2) 再用去支原体喷雾剂喷洒重要物料和器材，均匀擦拭表面以彻底去除环境中的支原体。紫外照射20~30min，通风后方可使用。

3. 阳参样品稀释

将Positive control用试剂盒中的Nuclease-free water稀释成以下梯度：50000，10000，5000，1000，500，100，50和10。

4. PCR 扩增

- (1) 按照下面PCR体系配置PCR预混体系（25 μ L/反应）：

体系组分	体积（每个反应）
Nuclease-free water	9 μ L
PCR primer mix	1 μ L
2xHigh-Fidelity polymerase mix	12.5 μ L
模板	2.5 μ L

- (2) PCR预混体系配置好后，加入到PCR管中，每管22.5 μ L。
- (3) 依次加入如下模板：
阴参：样品（A1，A2，A3，B1，B2，B3.....）
阳参：50000，10000，5000，1000，500，100，50，10
NTC：NTC孔不加模板

更多信息请登录吉凯基因官网，或致电来函吉凯基因。

注意：添加模板时，应减少空气流动，注意交叉污染；因PCR反应极其灵敏，为防止出现假阳性结果，建议加样时最后加阳参。

(4) 加完所有待检样品后，振荡器上混匀，简短离心后，进行PCR扩增，反应程序如下：

温度	94 ℃	94 ℃	55 ℃	72 ℃	72 ℃	8 ℃
时间	2 min	20 s	20 s	45 s	5 min	∞
循环数	1	35			1	1

5. PCR 产物的电泳检测

- (1) 配置2%的琼脂糖凝胶，稍冷后加入5 μL 10 mg/ml EB，注入凝胶模中，冷却凝固后，即可用于电泳。
- (2) 在每管PCR产物中加入6×Loading Buffer，取8μL进行上样，Mark上样4-6μL。
- (3) 电泳：130V电泳30min（根据电泳仪情况，适当调整时间）。
- (4) 电泳结束后取出凝胶于成像仪上拍照，并保存。

6. 结果判断

PCR扩增的结果有可能出现以下几种情况：

待检样品	体系敏感性评估				PCR体系污染验证	说明
	阳参 (< 100)	阳参 100	阳参 500	阳参 1000	阴参	
---	-	+	+	+	-	阴性
-- +	-	+	+	+	-	弱条带时，弱阳性，污染程度低，建议复检；亮条带时，样品添加存在交叉污染，建议复检
+++	-	+	+	+	-	阳性
+++	-	+	+	+	-	阳性
+++	-	+	+	+	+	PCR体系污染
+++	-	-	+/-	+	-	阳参稀释不佳，对结果影响不大
+++	-	-	-	-	-	阳参稀释存在较大误差，建议复检，阳性结果无影响，阴性结果存在假阴性

更多信息请登录吉凯基因官网，或致电来函吉凯基因。

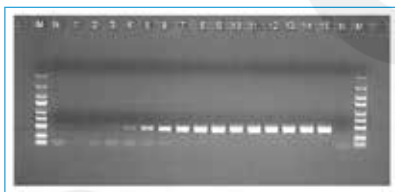


图1. 支原体PCR扩增结果。M: DNA marker (最下面五条带大小分别为100bp, 250bp, 500bp, 750bp和1000bp) ; N: negative control; 泳道1-9: 分别代表阳参拷贝数10, 50, 102, 5×102, 103, 5×103, 104, 5×104, 105; 泳道10-12: 分别代表样品A1, A2, A3; 泳道13-15: 分别代表样品B1, B2, B3。

■ 注意事项

1. 为了您的安全和健康, 使用本品时请穿实验服, 并配戴乳胶手套操作。
2. 操作时尽量少说话, 因人口腔也会传播支原体, 可能引起样本污染, 而造成假阳性; 整个检测过程中, 反应体系的配制、样本处理及加样、PCR扩增应分区域进行, 以避免污染。
3. 实验时, 试剂盒中的每种试剂在使用前应充分融化, 并上下颠倒多次以充分混匀, 请勿激烈振荡。
4. 反应管中加好所有的试剂后, 应尽快上PCR仪进行扩增, 以免形成过多的二聚体。
5. 结果异常时, 建议复检。
6. 结果为弱阳性时, 建议将96孔培养板继续培养7天, 再次检测。

***本产品仅供科研用途!**

■ Shanghai Genechem Co.,Ltd.

地址：上海张江高科技园区爱迪生路332号

邮编：201203

邮箱：service@genechem.com.cn

电话：8621 5132 0189

传真：8621 5137 0635

售前热线：800 720 0302 售后热线：400 621 0302