

支原体检测试剂盒

(冻干型试剂+试纸条)

货号：MYCO-NF-LYO

支原体 (Mycoplasma) 是一种没有细胞壁的原核生物，大小约 0.15 ~ 0.3 μ m，可穿过 0.22 μ m 孔径的滤膜。这意味着支原体很难被过滤掉。对于哺乳动物细胞的培养，支原体 (Mycoplasma) 污染是常见问题。与绝大多数的其他细菌污染物不同，支原体不会被肉眼检查到，并且由于其形态和特别小的尺寸而很难用光学显微镜进行检测。培养物中的支原体滴度可以达到 10⁸ CFU/mL 而不会导致培养基混浊。它们虽然通常不会杀死感染的哺乳动物细胞，但会通过改变细胞代谢、引起染色体畸变、减缓细胞生长和干扰细胞附着而对培养物造成严重影响。

根据 FDA、ATCC 和其他人的研究，估计单被支原体污染的细胞培养物占 5~30%。

细胞培养中常见的支原体污染 *M.arginini*, *M.hyorhina*, *M.hominis*, *M.fermentans*, *M. orale*, *M.salivarium*, *M.pirum*, *Acholeplasma laidlawii* 占 98%，另外 *M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. buccale*, *M. arthritis*, *M. pulmonis*, *M. gallinarum*, *M. canis*, *M.bovirhina*, *M.spumans*, *M.synoviae*. 占 1%。

本试剂盒采用恒温扩增技术，可以在 30 分钟检出常见的支原体污染，占细胞培养支原体污染种类的 99%。

试剂盒组成：

		Cat.: MYCO-NF-LYO -16	Cat.: MYCO-NF-LYO -32	Cat.: MYCO-NF-LYO-96
1	Reaction Tubes	16T	32T	96T
2	Rehydration Buffer (2X)	200 μ l	400 μ l	1000 μ l
3	Positive Control DNA (20X)	5 μ l	10 μ l	20 μ l
4	Starter (10X)	40 μ l	80 μ l	200 μ l
5	Diluent Buffer (稀释液)	1500 μ l	3000 μ l	8000 μ l
6	支原体检测卡	16	32	96

储存：

稀释液常温或 4 $^{\circ}$ C 保存，检测卡常温干燥避光保存，其他试剂保存在 -20 $^{\circ}$ C，有效期一年。

操作步骤：

- 取细胞培养液 1000 μ L 到 1.5 mL 离心管内，1000 rpm (约 150 g) 离心 5 min。
- 取上清 900 μ L 转移到另外一个离心管内，丢弃细胞沉淀。
- *将上清继续用 13000 rpm (约 16000 g) 高速离心 5 min，小心吸走全部上清（勿碰到沉淀，沉淀中含有支原体）。
- 用 20 μ L TE buffer (样品较稳定) 或者去离子水 (样品较不稳定) 重悬沉淀，吹吸均匀。
- 99 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟，简单离心 (1000 g, 5 seconds) 混匀后取上清进行检测。
- 按需取相应数量的 Reaction Tubes (冻干粉)，加入 (**注意：冰上操作**)

Rehydration Buffer(2X)	10 μ L
DNA template and ddH ₂ O	8 μ L
Starter (10X) **	2 μ L

注: **最后加入 Starter (10X) 启动液，混匀。无模板对照组加入 PCR grade water 8 μ L；检测组加入处理后的样品

2 μL 和 6 μL PCR grade water ; 阳性对照组加入 1 μL Positive control (20X) 和 7 μL PCR grade water ; 质控加入细胞培养液 2 μL 和 1 μL Positive control 和 5 μL PCR grade water, 使最终反应体积为 20 μL 。

7. 将反应管放置于 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min。

8. 反应结束后取 10 μL 反应液, 加入 Diluent buffer 80 μL , 混匀后吸取 70 μL 滴加到测试卡加样孔上。

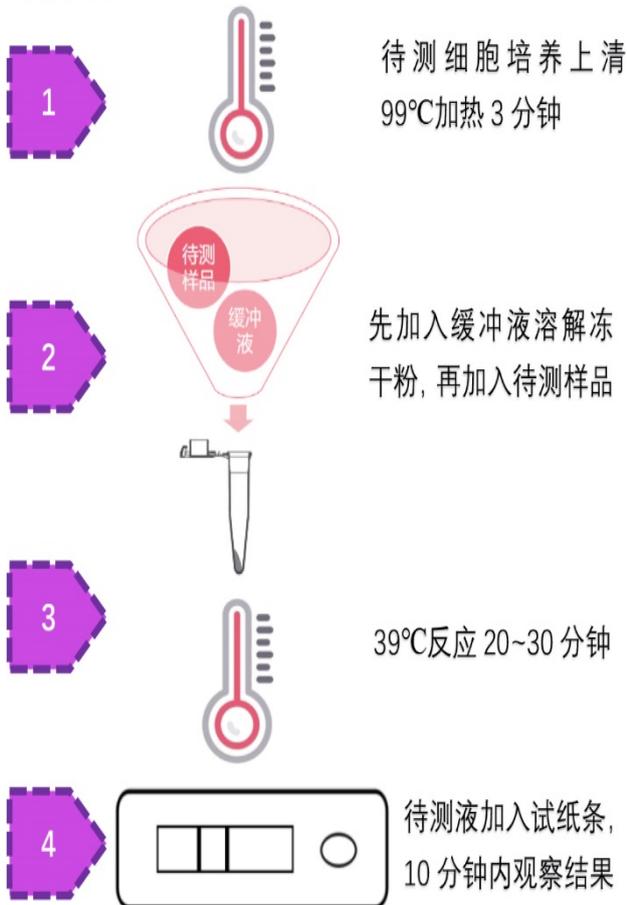
加样示例 :



结果示例 :



简易操作步骤示意图 :



注意事项 :

1. 贴壁细胞需培养至少 3 天且汇合度 90%, 取细胞培养液上清检测。
2. 悬浮细胞需培养至少 3 天, 1000 rpm (约 150 g) 离心 5 分钟, 目的是去除细胞, 减少对支原体检测的影响, 取细胞培养液上清检测。
3. 对于低浓度的支原体检测, 反应开始 3~4 分钟后, 轻弹管壁混匀后放回仪器反应。轻弹混匀有助于增加反应灵敏度。
4. *操作步骤中第3步是为了富集支原体并去除可能的干扰物质, 也可以采用直接检测的方法。
步骤如下: ①取 150 μL 细胞培养液加入到 1.5 mL 离心管内, 在离心机上 1000 rpm (大约 150 g) 低速离心 5 min, 取上清 100 μL 加入到另外一个 1.5 mL 离心管。② 99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min, 简单离心 (1000 g, 5 seconds) 混匀后取上清进行检测。
5. 关于阳性对照和无模板对照建议至少每 1~2 周检测一次。
6. 本试剂盒提供的阳性对照仅含有 DNA, 并不会造成支原体污染。无模板对照使用 PCR grade water 或者灭菌的 PBS 即可。
7. 试剂盒灵敏度非常高, 请注意避免扩增产物 (DNA) 对下次试验的污染。(avoid carry-over contamination)