

## EZ-PCR 支原体污染检测试剂盒

### 使用说明

#### 1. 产品描述

<b>产品名称</b>	EZ-PCR 支原体污染检测试剂盒
<b>货号</b>	20-700-20
<b>规格</b>	20 次
<b>储存条件</b>	-20℃
<b>保质期</b>	36 个月

支原体 (*Mycoplasma*) 是一种原核微生物，无细胞壁，因此对抑制细胞壁合成的青霉素并不敏感。支原体有数千种之多，以寄生或腐生营养方式，广泛存在于环境之中，并有多种可存活在人体生殖、泌尿与呼吸道中。

支原体污染的严重性：

1. 阻滞蛋白合成，细胞分裂与生长；
2. 影响免疫反应；
3. 影响病毒增殖；
4. 染色体异常和位移；
5. 改变细胞膜/壁(植物细胞)完整性；
6. 细胞分离物中，支原体能占高达 50%的蛋白质和 15 - 30%的 DNA；
7. 电转染率下降。

直接的培养法检测支原体过程复杂，需耗时数周，而且检测灵敏度低，因此支原体比其他污染更隐蔽。PCR 因其高敏感性、明确及快捷的特点简化了细胞培养中支原体污染检测过程。BI 公司的 EZ-PCR 方法检测支原体，检测用的样品仅经过离心分离及悬浮在缓冲液中即可开始 PCR 反应。琼脂糖凝胶电泳后，阳性模板得到一个 270bp 的片段，整个过程大概需要 3-4 个小时。

高敏感性及特异性的支原体种类如下：

<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma pirium</i>
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
<i>Mycoplasma capricolum</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Acholeplasma spp.</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Spiroplasma spp.</i>
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>

## 2. 预防和降低支原体污染的小技巧

- ◆ 一直保持严格的实验室管理规范
- ◆ 使用肥皂彻底洗手，风干
- ◆ 保持良好的个人卫生及使用无菌的实验室保护措施（如：无菌的、一次性手套、一次性的防护服等）
- ◆ 实验开始时，至少提前开启超净工作台15min；试验结束后仍要开超净工作台15min，以净化来自工作区剩余的悬浮物质
- ◆ 在实验前、后都用BI灭菌喷壶(Pharmacidal) 喷洒工作台面，将污染降到最低程度。要定期抽样检查表面。
- ◆ 用70%酒精擦拭培养烧瓶、瓶子及其他容器，让其风干。
- ◆ 只用无菌工具，在超净工作台及生物安全柜中一直保持严格的无菌条件
- ◆ 避免用口移液，人的口腔会携带支原体
- ◆ 减少工作间隔时间，以减少污染水平及更换个人的防护装备
- ◆ 定期清洁及维护超净工作台及生物安全柜
- ◆ 从正规厂家购买无病菌、无支原体、无血清及无动物来源添加剂
- ◆ 检测实验中所有的动物来源成分、血清及辅助培养基产品
- ◆ 确保细胞系来自于正规细胞库，在所有新的细胞系得到批准后之前，均需隔离，使用之前一定要得到确认及检测结果
- ◆ 定期检查一直使用的细胞系，而且污染的培养特征也是基于内部的质量保证协议
- ◆ 不要与其他工作人员共同使用打开的培养基、其他补充液或细胞系中的溶液，避免交叉污染
- ◆ 避免过度使用抗生素

## 3. 试剂盒成份

不需要准备放射性同位素标记的探针，不需要计算酶、dNTP's或者缓冲液浓度。试剂盒是即用型，独特的反应混合物包括了PCR中所需要的试剂。

货号	20-700-10	20-700-20
反应混合物	100µl	200µl
缓冲液	0.5ml	1ml
阳性模板	10µl	20µl

### 试剂盒中不提供的试剂：

- ◆ 矿物油
- ◆ 琼脂糖
- ◆ 无菌水

## 4. 特点

- 4.1 即用型，快速及相对简单的操作
- 4.2 反应混合物包括 PCR 所需的所有成份
- 4.3 不需事先做准备工作（除了样品被检测）
- 4.4 不与动物或细菌 DNA 反应，只针对于支原体 DNA
- 4.5 电泳后，阳性样品可以得到一个 270bp 的片段
- 4.6 实验结果可验证

## 5. 处理和稳定性

EZ-PCR 产品应该储存在-20℃，避免重复冻融，使用时，应该将反应混合物保持在冰上。产品不应长时间放在日光灯下，应避光保存在规定条件下，且在保质期内使用，产品可保持稳定性。

## 6. 使用方法

### 6.1 检测样品准备：

将 0.5-1.0ml 细胞培养上清液移至 2ml 离心管中。250g 离心 5min 以沉积细胞碎片。将上清液移入无菌离心管以 15,000-20,000g 速度离心 10 分钟以沉淀支原体。小心地移除上清液，保留沉淀（有时透明无色，并不能总被看到），重新用 50ul 缓冲液混合彻底。加热到 95℃持续 3 分钟。待检样品可储存在-20℃留待以后使用。

### 6.2 加样量：

反应试剂	加样量
H <sub>2</sub> O	35μL
反应混合物	10μL
检测样品	5μL

### 6.3 PCR 扩增及参数：

温度	时间	循环次数
94°C	30s	35 个循环
94°C	30s	
60°C	120s	
72°C	60s	
94°C	30s	
60°C	120s	
72°C	5min	

#### 6.4 凝胶电泳分析扩增后的产品；

#### 6.5 阳性对照：

使用 1 $\mu$ L 的阳性对照模板作为检测样品，PCR 的有效性即可被检测，使用带有引物的阳性模板的 PCR 产物大小为 270bp。



1. DNA size marker
2. Reaction mix 630270 + Positive 630270
3. Reaction mix 630270 + Positive 617082
4. Reaction mix 630270 + Negative: water
5. Reaction mix 630270 + Negative: Buffer solution
6. Reaction mix 617082 + Positive 630270

### 7. 常见问题

#### 7.1 检测前细胞培养中不能使用抗生素吗？

-- 建议在没有抗生素的情况下培养几天，以便最大化 PCR 观测信号。

#### 7.2 细胞从液氮中取出后能够立即检测吗？

--建议在无抗生素条件下生长至 90-100%融合后

#### 7.3 检测频率？

- ◆ 新细胞进入实验室
- ◆ 液氮保存前
- ◆ 定期每 2-3 个月
- ◆ 发现污染后每周
- ◆ 发现细胞特性发生改变或实验无法重复

#### 7.4 如何确定治疗是有效的？

--无抗生素培养细胞两周，再检测。

#### 8. 相关产品

产品名称	货号	规格	储存条件
Aquaguard-1	01-867-1	100ml	-20°C
BIOMYC-1	03-036-1	100ml/20ml/10ml	-20°C
BIOMYC-2	03-037-1	100ml/20ml/10ml	-20°C
BIOMYC-3	03-038-1	100ml/20ml/10ml	-20°C
Pharmacidal	IC-110100	5L/1L/100ml	15-30°C
Cell Synchronization Kit 细胞同步化试剂盒	12-008-60	60 次	-20°C
EZ-ECL Enhanced Chemiluminescence Detection Kit for HRP 化学发光增强试剂盒	20-500-120	120 次	2-8°C