**支原体污染PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for Mycoplasma Contamination**

**支原体污染PCR检测试剂盒**，可用于检测细胞培养中的支原体污染，**也可作为支原体通用PCR检测试剂盒使用**，可检测属于柔膜菌纲的支原体、脲原体、无胆甾支原体、螺原体、虫原体、中间原体等超过一百种，与柔膜菌纲以外的其他微生物没有特异性反应。

支原体是一种直径约为0.1-0.3 μm、无细胞壁的原核生物，具有变形能力，可透过常见过滤膜（0.22-0.45 μm），因此常规的无菌过滤方法不能将其去除，靶向细胞壁的抗生素也对支原体无效。支原体种类繁多，通常为寄生性或腐生性，一些种类可作为正常共生菌存在，另一些则具有致病性，部分种类具有细胞侵入性。

支原体污染是基础研究和工业生产中一个很常见的问题，可能有高达87%的细胞系发生过支原体污染。支原体在光学显微镜下不可见，对培养基的需求有限，一般不会引起培养物混浊，因此细胞被支原体污染一般难以察觉。支原体污染能消耗营养物，促进代谢积累，导致pH改变，诱导或抑制细胞因子表达，并改变培养细胞的代谢、增殖特征及形态。由于支原体污染能影响几乎每一个细胞参数，所以很多研究都强调常规检测正在培养的细胞，以确保观察到的结果不被支原体污染所损害。

使用支原体污染PCR检测试剂盒，能在2到3小时内获得可靠的结果，是一种灵敏度高、特异性强、快速的检测支原体污染的方法，具有以下特点：①特异性引物是针对高度保守的支原体16S rRNA序列设计的，可用于检测非常广泛的支原体种类，不受真核细胞或细菌DNA干扰。经本试剂盒测试的支原体菌株涵盖了所有常见的支原体污染种类；②灵敏度极高，最低仅需10个拷贝的支原体基因组即可使检测呈阳性；③阳性对照所用引物与支原体检测相同，可帮助判断假阴性现象，避免假阴性导致的误判；④包含PCR反应所需的所有成分，只需进行一次PCR反应，使用方便。

**货号：Myco-P-20 规格：20个反应**

**货号：Myco-P-50 规格：50个反应**

**货号：Myco-P-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 　组份 | 成份 | 体积（微升） |
| **Myco-P-20** | **Myco-P-50** | **Myco-P-100** |
| 组份A（蓝盖管） | Taq酶，dNTPs，染料 | 250 | 625 | 1250 |
| 组份B（绿盖管） | 上下游引物 | 50 | 125 | 250 |
| 组份C（黄盖管） | 阳性对照样品 | 50 | 125 | 250 |
| 水（白盖管） | 　无菌超纯水 | 200 | 500 | 1000 |

**保存条件：**保存于-20℃，避免反复冻融。没有反复冻融的情况下，保质期一年。

**操作步骤：**

**1、样品准备：**取1毫升细胞培养上清（贴壁和悬浮细胞都可以,最好已培养48小时以上），在16000g离心5分钟，小心弃去上清，避免丢失沉淀（沉淀量有可能很少，目视看不到）。将沉淀用无菌PBS重悬，在16000g离心5分钟，同样小心弃去上清，如此反复用无菌PBS洗三次。最后将获得的沉淀用100微升超纯水重悬，置于100℃水浴中孵育5分钟，如此获得的DNA可在4度保存1到2个月。对于组成成份较复杂的组织样本或拭子，建议使用DNA抽提试剂盒提取DNA，用于PCR反应。

**2****、PCR反应的准备：**

待试剂盒各组份融化后先瞬时离心，然后轻弹混匀。按下表在已灭菌的PCR管中配制反应体系，每次实验均需加一个阴性和一个阳性对照，测试反应管可以有多个。配制过程中应注意无菌，戴口罩，并注意避免操作产生的气溶胶造成样品间的交叉污染，推荐在有风压的设备如超净台或生物安全柜中进行操作。配制完毕后瞬时离心以使液体沉至管底。

本试剂盒非常灵敏，操作时产生的微量气溶胶即可造成样品之间的相互污染，因此须小心谨慎，避免剧烈操作。加液时枪头最好贴着管壁，所有管子用完即盖，对照样品和待测样品留在最后一步加入，取过样品的枪头用完即弃，尽量减少操作时污染的可能性。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 体积（微升） | 阴性 对照管 | 阳性 对照管 | 测试反应管\* |
| 组份A | 12.5 | 12.5 | 12.5 |
| 组份B | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 组份C | -　 | 2.5 | 2.5 / - \* |
| 水 | 10 | 7.5 | 5.5 / 8 \* |
| 待测样品 | -　 | -　 | 2 |
| 总体积 | 25 | 25 | 25 |

*\*测试反应管中加入组份C可以判别待测样品中是否含PCR抑制物；在不确定待测样品是否含有PCR抑制物的情况下，建议做两个反应：①待测样品与组份C共同反应，若无条带出现，则可判断为PCR反应受到了抑制，即存在PCR抑制物，可能产生假阴性结果；②待测样品单独反应，避免因加入组份C所致的灵敏度降低。如果已经确定待测样品中不含PCR抑制剂，则不需要与组分C共同反应。*

**3、PCR反应：**

降落PCR法（Touchdown PCR）：94℃变性2分钟；首循环：94℃变性30秒，68℃退火30秒，72℃延伸45秒；从第二到八个循环开始，每循环退火温度下降1℃，其余不变；从第九个循环开始，反应条件固定为：94℃变性30秒，60℃退火30秒，72℃延伸45秒，循环32次；循环结束后，在72℃延伸7分钟，最后保持在4℃。

**4、琼脂糖凝胶电泳：**

按常规方法准备好2%琼脂糖凝胶，加入EB或Gold-View等用于显色。每份反应液取8微升，无须加入上样缓冲液，直接加入凝胶加样孔中，另留一孔加入DNA marker（最好在400-700bp区间有显示条带），120伏电泳约30分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在643bp处有一条带，阴性对照无条带，支原体阳性条带在438-470bp区间。

**注意事项：**

1、组份A中含有染料，染料的加入不影响PCR反应，反应产物可直接电泳，节省时间。

2、本试剂盒检测范围涵盖所有常见支原体污染种类，真核细胞和革兰氏阴性菌不会造成干扰，与支原体亲缘关系较近的革兰氏阳性菌在反应中的灵敏度较支原体低1000-10000倍。

3、有时可直接用细胞培养上清进行PCR反应。培养上清中常含有高浓度的PCR抑制剂，可能导致假阴性结果，故不建议使用此法。多数PCR抑制剂可在提取DNA的过程中去除，某些PCR抑制剂，如黑色素，在提取DNA的过程中不能去除，此时可以通过加入高浓度（如2%）的BSA（牛血清白蛋白）中和其抑制活性。

4、本试剂盒仅供科研使用。

如需鉴别特定种类的支原体，可访问：<http://www.biothrive.cn/case/6589711321.html>

如需清除细胞支原体污染，可访问：<http://www.biothrive.cn/Product/2756935939.html>