

M5 PCR Mycoplasma Detection Kit

通用型 PCR 法支原体检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 PCR Mycoplasma Detection Kit	100T	MF439-01

【储存条件】

-20℃保存。

【产品简介】

哺乳动物细胞的培养，支原体（Mycoplasma）污染是个世界性的问题。支原体污染几乎可以改变细胞的所有参数，导致实验结果的不准确、甚至完全错误（支原体污染对细胞的详细危害，请参考本公司的网站：www.yisemed.com）。从 2013 年开始，《Nature》期刊已正式要求投稿的文章，如涉及细胞培养都要进行支原体检测。相信会有越来越多的高水平期刊将做出同样的支原体检测要求。培养法是相对可靠的支原体检测技术，但是该方法非常耗时的，需要数周，不适合作为细胞培养液中支原体污染的快速检测。此外，通过固体培养法无法检测污染细胞的一种最常见的支原体，即猪鼻支原体（M.Hyorhinis）。这是因为猪鼻支原体无法在支原体固体培养基上形成可见的菌落。而猪鼻支原体约占所有支原体污染的 20-50%。有的实验室使用荧光染色法检测支原体，但是该方法灵敏度太低，当检测成阳性时，细胞经常已经严重污染。目前，细胞培养液中支原体污染的检测通常使用的是 PCR 法。但是 PCR 法也有明显的缺点：

（1）整个过程大约需要 3 个小时；（2）由于细胞培养数天后，培养液中经常含有严重抑制 PCR 扩增的代谢物，所以样品的前处理一般是 PCR 法不可或缺的环节；（3）PCR 法的灵敏度有限，通常需要将培养液离心浓缩或者抽提 DNA 后再检测；（4）PCR 产物的电泳，需要用到 EB 等潜在的致癌物质；（5）需要用到 PCR 仪、电泳槽、凝胶成像仪、离心机等仪器。

本公司已经开发出了专用于体外细胞培养的《一步法恒温支原体检测试剂盒》，与 PCR 法支原体检测相比，其具有许多优点：耗时短、灵敏度高、操作简单、不会被细胞代谢产物抑制、结果无需电泳肉眼可直接判断等。尽管如此，《一步法恒温支原体检测试剂盒》可能也有个小缺点：因为《一步法恒温支原体检测试剂盒》需要至少同时使用 4 条引物才能完成扩增，其引物设计相对困难。虽然我们测试，该试剂盒至少可认识其说明书中列举的 13 种支原体，而这 13 种支原体大约占污染细胞的支原体种类的 99% 左右。但是，不排除《一步法恒温支原体检测试剂盒》无法识别个别在体外细胞培养中出现概率极低的支原体。为此，我们特意开发了具有广谱识别能力的《PCR 法支原体检测试剂盒》作为补充。

此外，作为支原体检测领域的共识，单独使用任何一种支原体检测方法，都无法做到 100% 正确，既不会漏检（假阴性），也不会多检（假阳性）。严格的支原体检测，至少需要使用两种（最好使用三种）不同原理的支原体检测方法同时进行检测，才能使检测结果接近 100% 正确。如果您想得到 100% 正确的支原体检测结果（比如，开展细胞治疗的客户，进行干细胞培养的客户，生产血清、胰酶、培养液的客户，出售各种原代培养细胞系和肿瘤细胞系的客户等），任选本公司生产的《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《发光法支原体检测试剂盒》中的两种进行检测，将会得到比较满意的结果，检测的正确率应该在 99.9% 以上。如果同时使用这三种试剂盒进行检测，检测的正确率应该在 99.99% 以上。

如果将所有待测样品统一接种到支原体液体培养基，然后在 37℃ 培养箱中培养 3 天后，再用本公司三种支原体检测试剂盒同时进行检测，则基本可以确保您的检测结果 100% 正确。通过将待测样品接种到支原体液体培养基培养 3 天的目的是：防止一些支原体含量极其微量的待测样品（比如：细胞培养用的血清、胰酶、抗生素、培养液和极个别的细胞培养上清），如果不经过大量繁殖，有可能漏检。

【产品用途】

可用于检测一切可能含支原体的样品，比如：（1）体外细胞培养的上清；（2）血清；（3）各种体液，如唾液、尿液、鼻腔分泌物等；（4）别的液体样品。本产品仅供研究使用。

【产品组成】

支原体引物和内参（100 次） 206 μL
阳性支原体 DNA 50 μL

注意 1：本试剂盒提供的支原体引物和内参可供至少 100 次支原体检测使用。

注意 2：以下试剂需要自己准备：（1）灭菌的去离子水；（2）普通的 Taq DNA 聚合酶和相应的缓冲液（3）2.5 mM 的 dNTP；（4）6× DNA 上样缓冲液。（以上产品都可以从聚合美购买）。

【操作步骤】

1、待测样品的准备

为了准确判断细胞是否有支原体的污染，待测的细胞培养液样品最好来源于至少培养 2 天（最好 3 天）且汇合度在 70-90%左右的细胞培养液上清（贴壁细胞）。悬浮培养的细胞也需要在换液传代后，至少让细胞生长 2 天（最好 3 天）再取培养液进行检测。取 150 μL 上述待测样品，在普通台式离心机上 1200 rpm (大约 150-200 g)离心 5 min，取离心后的上清 100 μL 用于支原体检测，丢弃下层剩余的 50 μL (含细胞沉淀)。收集并已经离心去除细胞的待测样品如果不立即检测，请放于 -20°C 或 -80°C 冰箱保存，不得放于室温或 4°C 冰箱。样品在 -20°C 至少可以保存一个月，在 -80°C 基本可以长期保存。

注意：本步骤的低速离心是为了去除哺乳动物细胞，以排除其不必要的干扰。所以离心力要严格控制在 150-200 g，该离心力下，哺乳动物细胞将被沉淀下来而支原体不会。如果错误使用更高的离心力将可能导致支原体也被离心下来，从而导致假阴性。

2、PCR 体系的配制

请按下表（表 1）进行 PCR 体系（总体积 25 μL ）的配制：

表 1.PCR 扩增体系的配制

	Negative Control	Positive Control	Sample
去离子水	17.5 μL	15.5 μL	15.5 μL
10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
2.5 mM dNTP	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
5 Units/ μL Taq DNA 聚合酶	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
支原体引物和内参	2 μL	2 μL	2 μL
阳性支原体 DNA 或待测样品	-	2 μL	2 μL

3、PCR 设置参数

1 cycle 94 $^{\circ}\text{C}$ for 2 minutes
 35 cycles 94 $^{\circ}\text{C}$ for 20 seconds
 55 $^{\circ}\text{C}$ for 20 seconds
 72 $^{\circ}\text{C}$ for 45 seconds
 1 cycle 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes
 1 cycle 8 $^{\circ}\text{C}$ for ∞

4、PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

- 配制 1.5%含溴化乙锭（EB）的 DNA 琼脂糖凝胶（注：如果不想接触强致癌物 EB，可以使用本公司生产的 5 \times AgarOrange 超级 DNA 上样缓冲液，使用该产品无需在凝胶中预先加入核酸染料）。
- 往每个 PCR 管内加入 5 μL 6 \times DNA 上样缓冲液。
- 取上述含 DNA 上样缓冲液的 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。
- 当溴酚蓝染料跑出 3 厘米左右时，停止电泳，拍照。

5、结果判断

PCR 扩增的结果有可能出现以下几种情况（表 2）：

表 2. PCR 扩增的可能结果

	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果
586 bp 内参条带	++	-	+	++	++	-
270 bp 左右条带	-	++++	+++	++	+	-
结果图示（见图 1）	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
支原体污染判断	阴性	极重度污染	重度污染	中度污染	轻度污染	PCR 被抑制

注：“-”代表没有条带；“+”代表有条带；“+”号越多代表条带越强。

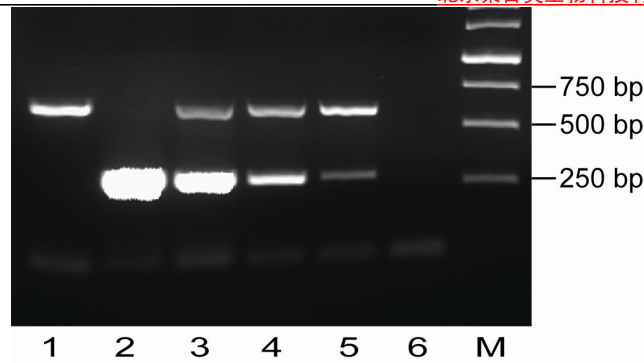


图 1. 支原体 PCR 扩增结果。586 bp 条带为内参条带，270 bp 左右的条带为支原体特异条带（各支原体的条带大小会略有不同，总体在 260-280 bp）。随着支原体 DNA 模板的增加，270 bp 左右的条带会逐渐增强而 586 bp 的内参条带会逐渐减弱，甚至消失。泳道 1：阴性对照或者没有支原体污染的样品；泳道 2：极重度支原体污染样品；泳道 3：重度污染样品；泳道 4：中度污染样品；泳道 5：轻度污染样品；泳道 6：PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制，导致扩增失败。M：DNA marker。

【注意事项】

- 1、每次检测都应该设有阴性对照，作用有：（1）由于有效的 PCR 扩增，阴性对照也会有一条 586 bp 的内参条带，这样可以保证本试剂盒含有的支原体引物和内参以及自己准备的 Taq DNA 聚合酶，dNTP 等试剂没有问题；（2）只有当阴性对照的结果没有出现 270 bp 左右的支原体特异条带时，别的样品的结果才是可信的。
- 2、如果 586 bp 条带和 270 bp 左右的条带都没有出现（如图 1，泳道 6），在排除 PCR 试剂的问题后（即阴性对照可以正常扩增），说明该样品含有抑制 PCR 扩增的代谢产物。有关 PCR 的扩增会被细胞的代谢产物抑制的问题，Sigma 公司的 LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit（货号 MP0035）的 PCR 法支原体检测试剂盒说明书中也特别提到了这点，说明这是一个 PCR 法支原体检测中经常遇到的问题，其强烈建议用试剂盒进行 DNA 提取后再进行鉴定。这也是 PCR 法支原体检测的致命弱点。为了克服该问题，您购买的 PCR 法支原体检测试剂盒，其扩增产物中必须含有内参（Internal Control）条带作为对照【本试剂盒的 586 bp 条带就是内参条带】。否则，如果没有内参作为对照，即使样品扩增后没有支原体特异条带，你也无法确定是因为样品确实没有支原体还是因为 PCR 被细胞的代谢产物抑制导致的假阴性。如果出现 PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制时，可以采取以下几种措施：
 - （1）使用血液基因组 DNA 抽提试剂盒，抽提支原体 DNA 后再进行 PCR 鉴定；
 - （2）使用本公司生产的《一步法恒温支原体检测试剂盒》进行检测，经严格测试，该试剂盒的扩增不会被细胞的代谢产物抑制；
 - （3）用 PBS 对待测样品进行离心清洗，去除样品中的抑制物。具体方法如下：取 1 mL 细胞上清，先 13000 rpm 离心 5 min，吸走 950 μ L 上清；加 PBS 90 μ L，再次离心，吸走 950 μ L 上清；再加 PBS 950 μ L，第三次离心，吸走 950 μ L 上清；吹匀剩余的 50 μ L，取 1 μ L 进行检测。但是：如果样品支原体含量较少，离心清洗可能导致漏检，因为离心清洗过程中，可能导致支原体部分丢失。
- 3、根据支原体 DNA 的序列，本试剂盒可以识别所有 100 多种至今已发现的支原体，具有广谱的识别能力。
- 4、如发现细胞被支原体污染，本公司提供细胞专用支原体清除和预防试剂。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。