

支原体PCR检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次

产品简介:

- 碧云天生产的支原体PCR检测试剂盒(Mycoplasma PCR Detection Kit), 是一种通过巢式PCR法(Nested PCR)检测培养细胞等生物材料中是否存在支原体污染的检测试剂盒。
- 支原体(Mycoplasma)是最小、最简单的原核生物。支原体有如下特征: 支原体无细胞壁结构, 所以针对细胞壁的许多常见的抗生素, 如青霉素或β-内酰胺类抗生素对支原体无效; 支原体大小介于细菌和病毒之间, 约为0.2-0.8μm, 所以部分支原体可通过0.22μm滤器, 常规的过滤对支原体无效; 很多支原体由于自身的生物合成能力有限而依靠宿主提供营养, 所以通常吸附或散落在细胞表面和细胞之间。支原体的这些特征使细胞培养过程中存在支原体污染的风险, 细胞的支原体污染已经成为一个世界性的普遍问题。
- 支原体污染可能会严重影响细胞的状态, 使细胞的基因表达、代谢特征发生变化, 导致细胞生长减缓、分化和死亡异常, 严重影响细胞功能。这些影响因素会严重影响实验结果的可靠性、可重复性和一致性, 因此支原体污染的检测非常重要。
- 细胞培养过程中的细菌、酵母或霉菌污染在光学显微镜下可见, 但支原体污染在光学显微镜下通常不可见, 必须通过特定的检测方法进行检测。检测支原体污染的常用方法有支原体分离培养、ELISA、发光法等特殊的生化检测以及DNA荧光染色检测等。上述检测方法中, 大多操作步骤相对比较烦琐、灵敏性不高、不能区分支原体种类、需要特殊仪器或所需时间较长。而PCR法操作相对比较简单便捷, PCR扩增后通过电泳分析即可确定是否有支原体污染, 并可根据扩增片段的大小大致预测至少11种所污染的支原体种属。如果有必要, 也可以对PCR产物进行常规测序以确定具体的支原体种属。
- 本支原体PCR检测试剂盒是利用两对引物通过巢式PCR法特异性扩增支原体基因组DNA片段, 从而实现对支原体的高灵敏度特异性检测的。原核生物的rRNA碱基序列非常保守, 而rRNA操纵子上编码rRNA的DNA间隔区(space region)在各种生物种间的碱基序列差别很大, 如16S和23S之间的间隔区。这个间隔区的DNA序列及长度在支原体各个种属间既有非常保守的部分, 也有较大差异的部分。在编码16S和23S的保守区DNA上设计一对F1/R1引物, 用于扩增16S和23S之间的间隔区, 这就是巢式PCR的第一轮PCR (1st PCR), 用于初步鉴定是否有支原体污染; 然后在编码16S和23S rRNA的DNA间隔区的保守区上设计一条F2引物, 在编码23S rRNA的DNA上设计一条R2引物进行巢式PCR的第二轮PCR (2nd PCR)。通过巢式PCR可以大大提高检测的特异性和灵敏度。本产品的检测原理请参考图1。

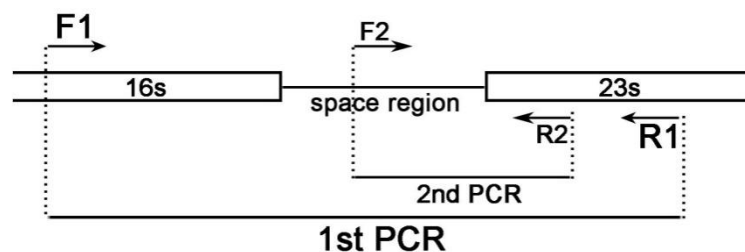


图1. 支原体PCR检测试剂盒的检测原理图。

- 本试剂盒可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染。
- 本试剂盒提供了阳性对照Control template, 便于确定PCR检测是否能正常工作, 及样品中是否存在抑制PCR反应的物质。
- 如果发现有支原体污染, 建议更换无污染的培养细胞进行培养。如果有必要预防或去除支原体, 可以使用专用的支原体预防或去除试剂(C0288、C0290、C0292、C0293)。
- 如果用于20μl的PCR反应体系, 本试剂盒共可以进行250次检测。如果用于50μl的PCR反应体系, 本试剂盒共可以进行100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0301S-1	1st PCR Primer Mix (50X)	100μl
C0301S-2	2nd PCR Primer Mix (50X)	100μl
C0301S-3	Control template	100μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，至少一年有效。

注意事项：

- 由于PCR反应非常灵敏，可以扩增目的基因序列超过1000万倍，在使用Taq酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。最好能在标准的PCR实验室中进行，没有标准PCR实验室的情况建议严格设置专用的PCR前区域和PCR后区域，两个区域必须在不同的房间并尽量间隔远一点以避免相互污染。PCR后区域的所有试剂、仪器、移液器、实验记录本等禁止带到PCR前区域。
- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系，这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™ 无菌滤芯盒装吸头 (FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 最好用专用的移液枪配制PCR体系。细胞培养使用过的移液枪可能会带有支原体污染。
- 实验操作过程尽量避免讲话，戴好一次性口罩，避免唾液支原体的污染。
- 使用含UDG的PCR体系可以最大限度的避免扩增产物的污染，降低假阳性概率。推荐碧云天 Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium) (D7362)、Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod) (D7364)及相应的dNTP/dUTP Mixture (D7376)。
- 一般情况，1st PCR可以初步鉴定是否有支原体污染，但建议进行2nd PCR以进一步确认。
- 本试剂盒不能检测出人肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 实验前的准备工作：

- a. 需要用户自己准备的器材
 - (a) PCR扩增仪。
 - (b) 琼脂糖凝胶电泳装置。
 - (c) 微量离心机。
 - (d) 无菌PCR管、离心管、枪头及移液枪。
- b. 试剂和检测样品准备
 - (a) 双蒸水或超纯水。
 - (b) 2X PCR Master Mix (D7228)、Easy-Load™ PCR Master Mix (2X) (D7255/D7256/D7259)或者其它Taq酶及PCR所需的dNTP等。
 - (c) 琼脂糖凝胶、电泳缓冲液、DNA分子量标准、电泳染料。
 - (d) 样品：用于检测支原体污染的样品是细胞接种后培养了3-6天的培养上清液，或者是培养液、血清；如果使用细胞悬液做样品，则需要提取DNA后再进行PCR。加入量一般为反应体系1/10的量或更少。

2. 1st PCR反应：

- a. 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将2X PCR Master Mix，例如Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)置于冰浴上或冰盒内。参考下表在冰浴上设置PCR反应：

试剂	最终浓度	体积	体积
双蒸水或超纯水	-	7.6-9.2μl	19-23μl
检测样品(DNA)或Control template	0.2pg/μl -20ng/μl	0.4-2μl	1-5μl
1st PCR Primer Mix (50X)	1X	0.4μl	1μl
Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	1X	10μl	25μl
总体积	-	20μl	50μl

注：Control template的推荐用量为1μl。

- b. PCR反应参数的设置可以参考如下示例：
 - STEP1 (起始变性): 94℃ 30sec
 - STEP2 (变性): 94℃ 30sec
 - STEP3 (退火): 55℃ 2min
 - STEP4 (延伸): 72℃ 1min
 - STEP5 (循环): Go To STEP2 for 30-35 cycles
 - STEP6 (最终延伸): 72℃ 5min
 - STEP7 (临时保存): 4℃ forever

3. 2nd PCR反应：

- a. 参考下表在冰浴上设置PCR反应：

试剂	最终浓度	体积	体积
双蒸水或超纯水	-	9.4μl	23.5μl

1st PCR产物	0.2pg/μl -20ng/ μl	0.2μl	0.5μl
2nd PCR Primer Mix (50X)	1X	0.4μl	1μl
Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	1X	10μl	25μl
总体积	-	20μl	50μl

b. PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

STEP1 (起始变性): 94°C 30sec

STEP2 (变性): 94°C 30sec

STEP3 (退火): 55°C 2min

STEP4 (延伸): 72°C 1min

STEP5 (循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6 (最终延伸): 72°C 5min

STEP7 (临时保存): 4°C forever

4. 扩增产物的电泳分析：

a. 反应结束后，取1st PCR及2nd PCR的反应产物各10μl，进行电泳确认扩增有无片段及片段大小。琼脂糖凝胶电泳结果示意图请参考图2。如果实验目的只是确定是否有支原体污染，1-2%的琼脂糖凝胶电泳均可；如果需要确定片段大小并据此大致推测污染支原体的种类，优先推荐使用2%的琼脂糖凝胶电泳。

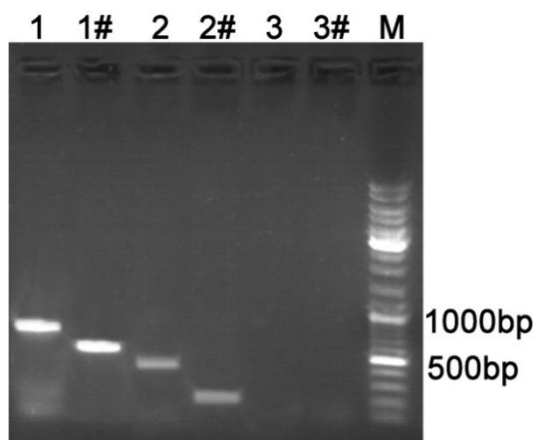


图2. 使用本支原体PCR检测试剂盒进行PCR检测时扩增产物的琼脂糖凝胶电泳示意图。1、2、3是1st PCR产物；1#、2#、3#是相应的2nd PCR产物。各泳道的模板分别是：1和1#，Control template；2和2#，支原体污染的细胞上清；3和3#，超纯水。M为DNA marker。

b. 以不同种属的支原体为模板，1st PCR及2nd PCR的反应产物的条带大小不同，具体扩增片段大小可参考下表。

本试剂盒确定可以扩增的支原体种类及1st PCR和2nd PCR扩增产物长度参考表：

种属	GenBank编号	1st PCR (bp)	2nd PCR (bp)
<i>Mycoplasma arginini</i>	JN935883	370	145
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	AY973560	408	157
<i>Mycoplasma capricolum</i>	AY800346	415	221
<i>Mycoplasma fermentans</i>	AY816338	492	195
<i>Mycoplasma hominis</i>	AY738737	370	148
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	JN935889	682	238
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	AY973572	452	211
<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	AY796063	502	196
<i>Mycoplasma orale</i>	AY737010	424	179
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	JN935865	477	190
<i>Mycoplasma salivarium</i>	AY786574	403	151
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	AY741673	482	154

注：本试剂盒主要用于检测是否有支原体污染，但也可以通过1st PCR和2nd PCR扩增产物长度大致预测所污染的支原体种属。如果有必要，也可以对PCR产物进行常规测序以确定具体的支原体种属。

5. 关于阳性对照反应：

a. 一方面阳性对照Control template可以单独使用，以确定PCR反应体系是否能正常工作。另一方面，阳性对照Control template也可以添加到样品中，以确定样品中是否含有抑制PCR反应的物质。Control template是人工合成的DNA片段，使用Control template时，1st PCR的反应产物是810bp，2nd PCR的反应产物是590bp。

b. 如果阳性对照Control template单独使用时没有获得扩增片段，提示PCR检测体系存在问题，需要考虑更换PCR反应相关试剂。

剂。

- c. 如果阳性对照Control template单独使用时获得了预期的扩增片段，而阳性对照Control template添加到样品一起进行PCR扩增反应时没有获得任何PCR扩增产物，提示PCR体系工作正常，但检测样品中存在抑制PCR反应的物质。此时建议将检测样品进行DNA抽提，再用提取的DNA作为模板进行扩增。也可以尝试将样品用超纯水或PBS适当稀释后再进行测试，此时如果样品中支原体的污染程度比较高，基本上不会影响检测，但如果样品中支原体的污染程度比较低，很可能会导致检测灵敏度显著下降。
- d. 如果阳性对照Control template单独使用时获得了预期的扩增片段，而阳性对照Control template添加到样品一起进行PCR扩增反应时可能仅获得支原体的PCR扩增产物或仅获得阳性对照Control template的扩增产物，也可能同时获得支原体和阳性对照Control template的扩增产物。其中一种模板量比较多时，通常更容易扩增获得哪种模板的PCR扩增产物。其中一种模板特别多时，另外一种模板可能检测不到明显的扩增。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0288S	支原体清除试剂	20mg
C0288M	支原体清除试剂	100mg
C0290S	支原体清除试剂Plus	10mg
C0290M	支原体清除试剂Plus	50mg
C0292-2ml	支原体预防去除试剂I	2ml
C0292-10ml	支原体预防去除试剂I	10ml
C0293-2ml	支原体预防去除试剂II	2ml
C0293-10ml	支原体预防去除试剂II	10ml
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
C0298S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒	20次
C0298M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒	100次
C0299S	Myco-Lumi™发光法支原体检测阳性对照	20次
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7255-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	100次
D7255-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7255-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	2000次
D7255-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	10000次
D7256-1ml	Easy-Load™ PCR SuperMix (Green, 2X)	100次
D7256-4ml	Easy-Load™ PCR SuperMix (Green, 2X)	400次
D7256-20ml	Easy-Load™ PCR SuperMix (Green, 2X)	2000次
D7259-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	100次
D7259-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次
D7259-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	2000次
D7259-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	10000次
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250μl
FTUB002	200微升薄壁PCR管(凸盖)	1000个/包
FTUB003	200微升薄壁PCR管(平盖)	1000个/包
FTUB108	200微升八联管(PCR排管)	200排/包
FTUB110	96管PCR板	10个/包
FTUB111	96管PCR板(带边框)	10个/包

FTUB113	八联管盖(用于八联管或96管PCR板)	200条/包
FTUB116	十二联管盖(用于96管PCR板)	200条/包
FTUB322	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包
FTUB323	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包, 10包/箱
FTUB328	BeyoGold™ PCR八联排管(0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒
FTUB329	BeyoGold™ PCR八联排管(0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
ST873-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR级, Sterile)	100ml

使用本产品的文献：

1. Xiaotong Wang,Shiming Xie,Zili Li,Zhen Ye,Xiuli Gu,Liquan Zhou,Honggang Li.Generation of an iPSC line (HUSTi002-A) from fibroblasts of a patient with Sertoli cell-only syndrome carrying c.731_732delAT in PIWIL2 gene Stem Cell Res. 2020 Jan;42:101703.;doi: 10.1016/j.scr.2020.101703

2. Gang Yang,Guangbing Xiong,Mengyu Feng,Fangyu Zhao,Jiangdong Qiu,Yueze Liu,Zhe Cao,Huanyu Wang,Jinshou Yang,Lei You,Lianfang Zheng,Taiping Zhang,Yupeai Zhao.OLR1 Promotes Pancreatic Cancer Metastasis via Increased c-Myc Expression and Transcription of HMGA2 Mol Cancer Res. 2020 May;18(5):685-697.;doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0718

3. Wei Tang,Meng Li,Xin Qi,Jing Li. β 1,4-Galactosyltransferase V Modulates Breast Cancer Stem Cells through Wnt/ β -catenin Signaling Pathway Cancer Res Treat. 2020 Oct;52(4):1084-1102.;doi: 10.4143/crt.2020.093

4. Shibin Qu,Kunwei Niu,Jianlin Wang,Jimin Dai,Anutosh Ganguly,Chao Gao,Yuzi Tian,Zhibin Lin,Xisheng Yang,Xuan Zhang,Zhengcai Liu,Haimin Li.LINC00671 suppresses cell proliferation and metastasis in pancreatic cancer by inhibiting AKT and ERK signaling pathway Cancer Gene Ther. 2021 Apr;28(3-4):221-233.;doi: 10.1038/s41417-020-00213-4

5. Mu Zhang,Chunjie Yang,Meng Zhu,Li Qian,Yan Luo,Huimin Cheng,Rong Geng,Xiaojun Xu,Cheng Qian,Yu Liu.Saturated fatty acids entrap PDX1 in stress granules and impede islet beta cell function Diabetologia. 2021 May;64(5):1144-1157.;doi: 10.1007/s00125-021-05389-4

6. Zhiyong Xiong, Wei Xiong, Wen Xiao, Changfei Yuan, Jian Shi, Yu Huang, Cheng Wang, Xiangui Meng, Zhixian Chen, Hongmei Yang, Ke Chen, Xiaoping Zhang. NNT-induced tumor cell "slimming" reverses the pro-carcinogenesis effect of HIF2a in tumors. Clin Transl Med. 2021 Jan;11(1):e264.

7. Xiaonan Wang, Qianying Guo, Hao Wang, Xiaodong Yuan, Bijun Wang, Peter E Lobie, Tao Zhu, Sheng Tan, Zhengsheng Wu. PCBP2 Posttranscriptional Modifications Induce Breast Cancer Progression via Upregulation of UFD1 and NT5E. Mol Cancer Res. 2021 Jan;19(1):86-98.

8. Xin Zheng, Rui Liu, Chenchen Zhou, Haopeng Yu, Wanyi Luo, Jianhui Zhu, Jiaxin Liu, Zhe Zhang, Na Xie, Xian Peng, Xin Xu, Lei Cheng, Quan Yuan, Canhua Huang, Xuedong Zhou. ANGPTL4-Mediated Promotion of Glycolysis Facilitates the Colonization of Fusobacterium nucleatum in Colorectal Cancer. Cancer Res. 2021 Dec 15;81(24):6157-6170.

9. Aixin Li, Kaitao Zhao, Bei Zhang, Rong Hua, Yujie Fang, Wuhui

Jiang, Jing Zhang, Lixia Hui, Yingcheng Zheng, Yan Li, Chengliang Zhu, Pei-Hui Wang, Ke Peng, Yuchen Xia. SARS-CoV-2 NSP12 Protein Is Not an Interferon- β Antagonist. J Virol. 2021 Aug 10;95(17):e0074721.

10. Xianjie Lu, Na Song, Wei Wang, Yanming Liu, Hao Song, Li Xu, Yan Wang, Chuanfei Wei, Juanli Chen, Xiaofei Yang, Fabin Han.. Generation of integration-free human iPSC line LCPHi001-A from a Parkinson's disease patient carrying the RecNciI mutation in GBA gene. Stem Cell Res. 2021 Oct;56:102514.

11. Ping Liu, Yifei Bian, Jia Zhong, Yang Yang, Xiang Mu, Zhongjie Liu. Establishment and characterization of a rat intestinal microvascular endothelial cell line. Tissue Cell. 2021 Oct;72:101573.

12. Yue Wang, Weiyao Xiong, Shuangxia Zhao, Bin Li, Alex Chia Yu Chang. Generation of two induced pluripotent stem cell lines, SHIPMi001-A from a patient with hypertrophic cardiomyopathy caused by MYBPC3 gene mutation and SHIPMi002-A from a healthy male individual. Stem Cell Res. 2021 Nov 10;57:102594.

13. Ziwei Yuan, Bin Wang, Yilong Teng, William Ho, Bin Hu, Kofi Oti Boakye-Yiadom, Xiaoyang Xu, Xue-Qing Zhang. Rational design of engineered H-ferritin nanoparticles with improved siRNA delivery efficacy across an in vitro model of the mouse BBB. Nanoscale. 2022 May 5;14(17):6449-6464.

14. Xiaoyan Zhang, Ling Yang, Wanjun Lei, Qiang Hou, Ming Huang, Rongjing Zhou, Tariq Enver, Shixiu Wu. Single-cell sequencing reveals CD133+CD44--originating evolution and novel stemness related variants in human colorectal cancer. EBioMedicine. 2022 Aug;82:104125.

15. Xianjie Lu, Wei Wang, Yanming Liu, Na Song, Mengpeng Li, Xin Mu, Nan Zhang, Qingfa Chen, Licheng Jiang, Xianglin Kong, Peng Sun, Jiabei Tong, Yunping Zhang, Jingtao Li, Shengjun Ma, Fabin Han. Establishment and characterization of human induced pluripotent stem cell line from a Parkinson's disease patient harboring VPS13A gene mutation. Stem Cell Res. 2022 Apr;60:102685.

16. Maisumu Gulimiheranmu, Shuang Li, Junmei Zhou. Generation of a MIR5004 knockout cell line from human induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 gene editing. Stem Cell Res. 2022 Jul;62:102805.

17. Shuyu Fang, Anle Zeng, Qiling Xu, Lina Zhou, Zhiyong Zhang, Yunfei An, Xiaodong Zhao. Generation of human induced pluripotent stem cell line from peripheral blood mononuclear cells from an activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome patient. Stem Cell Res. 2022 Jul;62:102822.