

EZ-Detect™支原体检测试剂盒 (PCR 法)

■ 产品简介

本试剂盒为 EZ-Detect™支原体检测试剂盒，是一种通过 PCR 法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。

研究表明，至少二十多种支原体能污染细胞，其中最常见有：口腔支原体 (M. orale)、精氨酸支原体 (M. arginini)、猪鼻支原体 (M. hyorhinis)、发酵支原体 (M. fermentans)、人型支原体 (M. hominis)、唾液支原体 (M. salivarium)、肺支原体 (M. pulmonis) 和梨支原体 (M. pirum) 等。培养细胞的支原体污染率在 4%-92% 不等，其污染来源包括工作环境、操作者本身（一些支原体是人体的正常菌群）、培养基、血清、细胞交叉污染、实验器材和用来制备细胞的原始组织或器官的污染。

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、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。

本支原体 PCR 检测试剂盒是利用多对引物通过多重 PCR 法特异性扩增支原体基因组保守区域，从而实现对支原体的高灵敏度特异性检测的。经验证，能高效准确检出包括上述多种支原体共 75 种支原体污染^{*见附录}，覆盖率高。

与常规的 PCR 法支原体检测试剂盒相比，本试剂盒对培养液上清中的抑制物耐受度更强，因此极大地降低弱阳性、假阴性的出现；与市面上等温扩增技术的 PCR 法相比，可以有效避免培养基成分对反应结果判断（颜色）的干扰，及气溶胶污染的影响，适用于各种悬浮、贴壁培养细胞，包括 CHO、Vero、293 等，具有广泛的培养基兼容性。

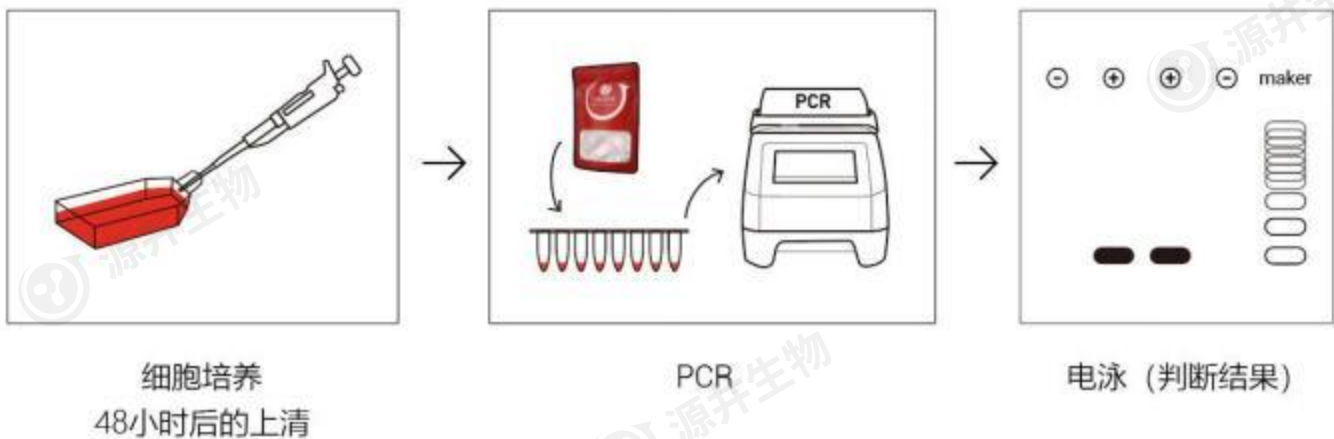


试剂盒组成

货号	组分	规格	储存温度
YK-DP-20	Mycoplasma Detect Enzyme	150 μL	-20℃
	Mycoplasma Ctrl	200 μL	-20℃
	Mycoplasma Primer MIX	60 μL	-20℃
YK-DP-50	Mycoplasma PCR Enzyme	375 μL	-20℃
	Mycoplasma Ctrl	200 μL	-20℃
	Mycoplasma Primer MIX	150 μL	-20℃

*试剂有效期为12个月，请注意试剂保存温度。

1 支原体检测操作图示



操作步骤

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) 琼脂糖凝胶、电泳缓冲液、DNA 分子量标准、电泳染料。
- (c) 样品：用于检测支原体污染的样品是细胞接种后至少培养了 48h 的培养上清液，或者是培养基、血清；

2. PCR 鉴定

- (a) 将 EZ-Detect™支原体检测试剂盒从-20℃冰箱取出，放置在冰盒中融解，按照下表 1 配制 PCR 体系，混匀。
- (b) PCR 上机反应，设置程序见表 2。
- (c) PCR 产物直接点样跑琼脂糖凝胶电泳（不需加 Loading Buffer），若有 PCR 条带则样品含有支原体污染（Mycoplasma Ctrl 反应孔必须有条带，实验才算成功）。

表 1. PCR 配制体系

试剂	体积（每反应）
Mycoplasma Detect Enzyme	7.5 μL
检测样品/Mycoplasma Ctrl	2 μL
Mycoplasma Primer MIX	2.6 μL
ddH ₂ O	3 μL
总体积	15 μL

注：PCR 对照体系扩增出来的条带大小约为 500 bp。



表 2. PCR 鉴定程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	3 min	1 cycle
循环扩增	95°C	15 s	30~32 cycles
	50°C	15 s	
	72°C	1 min/kb	
延伸补偿	72°C	5 min	1 cycle

3. 结果判定

PCR 反应结束后，取 10μl 反应产物（不需加 Loading Buffer），进行琼脂糖凝胶电泳确认扩增有无条带及条带亮度（琼脂糖凝胶浓度为 1-2%均可），琼脂糖凝胶电泳结果示意图请参考图 1。

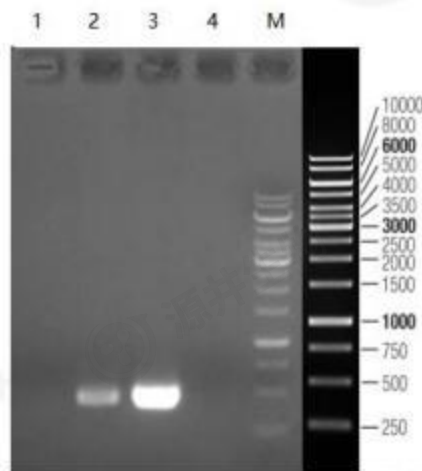


图 1 电泳胶图

注：1-4 依次为：阴性样品、阳性样品、阳性对照、阴性对照，M 为 Marker

常见问题



1. EZ-Detect™支原体检测试剂盒是否可检测 DMSO、乙醇等有机溶剂中是否存在支原体污染？

A: Mycoplasma Detect Enzyme在 DMSO、乙醇等有机溶剂以及强酸强碱环境中，不稳定易变性，不可用于有机溶剂、强酸强碱环境下的支原体检测。

2. EZ-Detect™支原体检测试剂盒除了可以检测细胞样品外，还可以检测培养基和血清吗？

A: EZ-Detect™支原体检测试剂盒用于各种悬浮、贴壁培养细胞的培养液上清外，也可用于检测各种培养基及血清是否存在支原体污染，但不保证可检测酶原料。

3. 关于阳性对照反应：

- a. Mycoplasma Ctrl 可以单独使用，以确定 PCR 反应是否成功；
- b. Mycoplasma Ctrl 也可添加到样品中，以确定样品中是否含有特殊的抑制 PCR 反应的物质；
- c. 如果 Mycoplasma Ctrl 单独使用时没有获得扩增片段但样品能获得扩增条带，提示该次 PCR 检测反应存在问题，需重新进行 PCR 检测反应；

*附录：可检测支原体清单

支原体种类	中文名
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	牛莱氏无胆甾原体
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	猪鼻支原体
<i>Mycoplasma orale</i>	口腔支原体
<i>Mycoplasma hominis</i>	人型支原体
<i>Mycoplasma arginini</i>	精氨酸支原体
<i>Mycoplasma salivarium</i>	唾液支原体
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	产碱支原体
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	鸡支原体
<i>Mycoplasma columbinum</i>	鸽支原体
<i>Mycoplasma pirum</i>	梨支原体
<i>Mycoplasma alvi</i>	蜂房支原体（牛肠道和泌尿生殖道）



<i>Mycoplasma fermentans</i>	发酵支原体
<i>Mycoplasma primatum</i>	原状支原体
<i>Mycoplasma bovis</i>	牛支原体
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	牛生殖器支原体
<i>Mycoplasma caviae</i>	豚鼠支原体
<i>Mycoplasma maculosum/Mycoplasma maculosa</i>	斑点支原体
<i>Mycoplasma iners</i>	惰性支原体 (鸡)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	肺炎支原体
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	鸡毒支原体
<i>Mycoplasma synoviae</i>	滑膜支原体 (禽源)
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	牛鼻支原体
<i>Mycoplasma tauri</i>	牛磺酸支原体 (牛生殖道)
<i>Mycoplasma gallinacea</i>	胆小球支原体 (鸡)
<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	火鸡支原体
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	梅莱格里迪斯支原体 (火鸡源)
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	无乳支原体 (山羊源)
<i>Mycoplasma anserisalpingitidis</i>	鹅输卵管支原体
<i>Mycoplasma anatis</i>	鸭支原体
<i>Mycoplasma pullorum</i>	白痢支原体 (禽源)
<i>Mycoplasma phocoeninasale</i>	鼠海豚支原体
<i>Mycoplasma struthionis</i>	刺脯支原体 (鸵鸟)
<i>Mycoplasma nasistruthionis</i>	鼻翼支原体 (鸵鸟)
<i>Mycoplasma columbinasalis</i>	鸽子支原体 2
<i>Mycoplasma glycophila</i>	嗜糖支原体 (鸟源)
<i>Mycoplasma leonicaptivi</i>	捕狮支原体 (狮子)
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	鳄鱼支原体
<i>Mycoplasma alligatoris</i>	短吻鳄支原体
<i>Mycoplasma testudineum</i>	睾丸支原体 (沙漠陆龟)
<i>Mycoplasma edwardii</i>	爱德华支原体 (犬源)
<i>Mycoplasma cynos</i>	犬科支原体
<i>Mycoplasma felis</i>	猫支原体
<i>Mycoplasma citelli</i>	松鼠支原体 (地松鼠)
<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	溶神经中支原体 (鼠源)
<i>Mycoplasma columboralis</i>	鸽子支原体 1
<i>Mycoplasma miroungirhinis</i>	米氏支原体 (北方象海豹)
<i>Mesomycoplasma dispar</i>	异形支原体 (小牛肺分离)
<i>Mycoplasma flocculare</i>	絮状支原体 (猪源, 与猪肺炎支原体共生)
<i>Mycoplasma marinum</i>	海洋支原体 1 (头足类动物分离)
<i>Mycoplasma todarodis</i>	海洋支原体 2 (头足类动物分离)
<i>Mycoplasma elephantis</i>	象皮支原体



<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	绵羊肺炎支原体
<i>Mycoplasma phocoenae</i>	海港鼠海豚支原体
<i>Mycoplasmopsis opalescens</i>	乳白色支原体 (犬源)
<i>Mycoplasmopsis phocirhinis</i>	港海豹支原体
<i>Mycoplasma miroungigenitalium</i>	米氏支原体 (北方象海豹)
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	嗜脂支原体 (鸟源)
<i>Mycoplasma simbae</i>	辛巴支原体 (狮子)
<i>Mycoplasma mucosicanis</i>	犬粘膜支原体
<i>Mycoplasma californica</i>	加州支原体
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	猪肺炎支原体
<i>Mycoplasma genitalium</i>	生殖支原体
<i>Mycoplasma tullyi</i>	塔利支原体 (洪堡企鹅分离)
<i>Mycoplasma testudinis</i>	龟支原体 (陆龟分离)
<i>Mycoplasma verecunda</i>	黄原体支原体 (牛源)
<i>Mycoplasma enhydrae</i>	水肿支原体 (南部海獭)
<i>Mycoplasma zalophi</i>	扎洛菲支原体 (海狮分离)
<i>Mycoplasma imitans</i>	模仿支原体 (鸟源)
<i>Mycoplasma mustelae</i>	水貂支原体
<i>Mycoplasma cricetuli</i>	中国仓鼠支原体
<i>Mycoplasma leachii</i>	利奇支原体 (牛源)
<i>Mycoplasma feriruminatoris</i>	亚铁支原体 (野生羊亚科)
<i>Mycoplasma mycoides subsp. capri str.</i>	丝状支原体. 山羊亚种
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	腐烂支原体 (山羊源)
<i>Mycoplasma yeatsii</i>	山羊支原体

