

# MycoTest™ Nested PCR Mycoplasma Detection Kit

## MycoTest™ 巢式 PCR 支原体检测试剂盒说明书

(M1001, M1002)

### 一. 产品描述

MycoTest™ 巢式 PCR 支原体检测试剂盒用于定性检测细胞培养中的支原体污染。95%以上的细胞培养中的支原体污染是由 *Mycoplasma fermentans*, *M. orale*, *M. pirum*, *M. hyorhinitis*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. arginine* 和 *Acholeplasma laidlawii* 支原体所导致。该试剂盒通过巢式 PCR 方法扩增细胞培养基中包括以上八种和其他多种常见支原体的保守基因片段，从而判断是否存在支原体污染。该试剂盒具有快速，灵敏度高和特异性高的特点。每个反应能够检测到低至 10 个支原体基因数，特别是对 *Acholeplasma laidlawii* 支原体的检测灵敏度有很大的提高，并且和细菌或培养细胞无交叉反应。

### 二. 产品组成

MycoTest™ 巢式 PCR 支原体检测试剂盒包含即用引物 2 管和反应内参 1 管，规格如下：

目录号	规格	组分
M1001	25T	引物 P1 一管 (50 μL)，引物 P2 一管 (50 μL)，PCR 反应内参一管 (50 μL)
M1002	50T	引物 P1 一管 (100 μL)，引物 P2 一管 (100 μL)，PCR 反应内参一管 (100 μL)

### 三. 实验步骤

#### 1. 待测细胞培养基准备

- 1) 从对数生长期的细胞培养中取 1mL 细胞培养基。
- 2) 细胞培养基室温离心 200 g，5 分钟。将大约 800 μL 培养基转到新的离心管中，注意不要带入离下的细胞碎片
- 3) 用以上准备的细胞培养基作为巢式 PCR 的模板进行支原体检测。

#### 2. 巢式 PCR 反应

- 1) 第一 PCR 反应：以通用的 2X PCR 预混液试剂为例：

PCR 反应组装（推荐冰上配制）

组分	体积（ $\mu\text{L}$ ）
2xPCR Mix	25
1 <sup>st</sup> PCR 引物 P1	2
模板（细胞培养基）	1
PCR 反应内参	2
加无菌超纯水至	50

PCR 反应条件：30 循环，条件见下表

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$	5min	1
变性	94 $^{\circ}\text{C}$	30s	30
退火	55 $^{\circ}\text{C}$	30s	30
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	40s	30
终延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	5min	1

- 2) 从第一 PCR 反应中取 1  $\mu\text{L}$  作为第二 PCR 的模板并用引物 P2 进行第二 PCR。第二 PCR 反应组装（推荐冰上配制）见下表。PCR 反应条件同第一 PCR 反应。

组分	体积（ $\mu\text{L}$ ）
2xPCR Mix	25
2 <sup>nd</sup> PCR 引物 P2	2
模板（1 <sup>st</sup> PCR 产物）	1
加无菌超纯水至	50

- 3) 准备 2% 的琼脂糖胶。取 10  $\mu\text{l}$  的第二 PCR 产物做 DNA 电泳。

### 3. 结果

PCR 反应内参为 515 bp 单一 DNA 条带，常见支原体污染会产生 236 bp-365 bp 单一 DNA 条带，*Acholeplasma laidlawii* 污染会产生 426 bp 和 219bp 的双 DNA 条带。

## 四. 运输和保存方式

冰袋运输。-20 $^{\circ}\text{C}$  避光储存，有效期 18 个月。

## 五. 注意事项

1. 建议 PCR 试剂为热启动 Taq 酶系列。使用 2X PCR 预混液应不含 DNA 凝胶电泳染液。
2. 建议在超净工作台内组装 PCR 反应，避免交叉污染和气溶胶污染。使用无核酸酶的枪头和反应管，建议使用带滤芯的枪头。

3. 非经严格验证，不建议随意改变反应试剂用量。
4. 按照说明书分装储存反应试剂，保证试剂的稳定性。
5. 本产品仅作科研用途。