



维根生物科技有限公司

Vigen Biotechnology (Zhenjiang) Co., Ltd

VigenBR

Tel: 183 628 99236

E-mail: 253540644@qq.com

支原体 PCR 检测试剂盒

一、产品介绍

本试剂盒用于细胞培养过程中支原体(Mycoplasma)污染的检测。支原体是一种原核微生物，无细胞壁，对双抗（青霉素和链霉素）不敏感。支原体污染不易察觉，能够在培养物间扩散，对细胞培养危害严重。支原体的 PCR 方法检测灵敏度高、操作简单快速。本试剂盒通过 PCR 方法检测培养细胞等生物材料中的支原体，所用引物为根据支原体 16S-23S rRNA 序列保守区域设计，只特异性扩增支原体 DNA。检测过程包括 PCR 扩增及电泳分析。该试剂具有以下特点：

- (1) 即用型：只需加入 1 μ L 细胞培养液上清即可；
- (2) 高灵敏度：检测极限低至 100 拷贝/ μ L；
- (3) 检测结果稳定：试剂盒反复测试，检测结果稳定。

本试剂盒可以识别在体外细胞培养中曾经报道出现的 20 种支原体，根据文献报道，这些支原体基本能占污染细胞的支原体种类的 100%。具体有：(1) *M. hyorhinitis*、(2) *M. fermentans*、(3) *M. arginini*、(4) *M. hominis*、(5) *M. orale*、(6) *M. salivarium*、(7) *M. pirum*、(8) *A. laidlawii*、(9) *M. agalactiae*、(10) *M. bovis*、(11) *M. bovoculi*、(12) *A. axanthum*、(13) *M. buccale*、(14) *M. pneumoniae*、(15) *M. arthritidis*、(16) *M. pulmonis*、(17) *M. gallisepticum*、(18) *M. gallinarum*、(19) *M. canis*、(20) *Ureaplasma urealyticum* (注：M.为 Mycoplasma 的缩写；A.为 Acholeplasma 的缩写)。

试剂盒组成

产品名称	规格 (50 次)	规格 (100 次)	规格 (200 次)
PCR Mixture	500 μ L*2	500 μ L*4	1000 μ L*4
Positive Control	30 μ L*2	60 μ L*2	120 μ L*2
Negative Control	30 μ L*2	60 μ L*2	120 μ L*2
存储条件	-20 $^{\circ}$ C		
有效期	18 月		

运输与保存：本产品冰袋运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保质期 18 个月，建议分装保存，避免反复冻融。

注意事项：

- 1) 长期不用时，可-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。
- 2) PCR 反应极其灵敏，为防止假阳性，加样时，最后加阳性对照
- 3) 本产品仅限科研使用！



www.vigenbio.com



Technical Support



维根生物科技有限公司

Vigen Biotechnology (Zhenjiang) Co., Ltd

VigenBR

Tel: 183 628 99236

E-mail: 253540644@qq.com

二、使用方法

1.1 待检测样品准备

将 90 μL 无菌 PBS 加入到 1.5 mL 无菌离心管，然后取 10 μL 细胞培养液于离心管，混匀（10 倍稀释待测样品）。室温，12000g，离心 2 min 沉淀细胞碎片。

1.2 PCR 反应程序设置

Steps	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	3 min	1
2	95°C	15 sec	
3	60°C	15 sec	35
4	72°C	10 sec	
5	72°C	3 min	1

1.3 PCR 扩增体系建立

1) 解冻试剂：冰上融化 Positive、Negative Control 和 PCR Mixture，分别混匀；

2) 分装 Mixture：吸取 19 μL PCR Mixture 于 PCR 管，分装管数为待测样品数量加上阳性对照和阴性对照，PCR 管分别标记为：

1N（第一管，Negative Control），

2P（第二管，Positive Control），

3S1（第三管，待测 Sample 1），

4S2（第四管，待测 Sample 2）

……；

3) 检测样品加样：

在 1N 管中添加 1 μL Negative Control，

在 2P 管中添加 1 μL Positive Control，

在样品管中分别添加 1 μL 处理好的细胞培养液（见使用方法 3.1）；



www.vigenbio.com



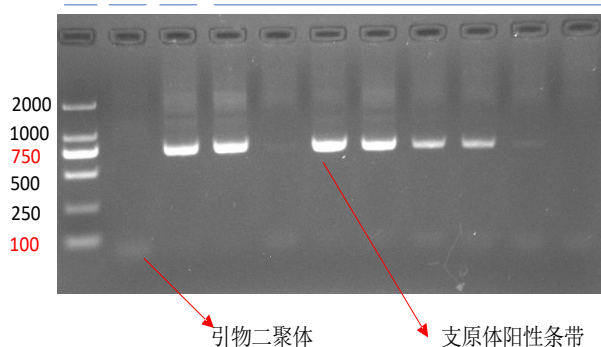
Technical Support

4) 样品混匀后进行 PCR 扩增。

1.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析:

取 5~10 μ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 DL2000 Marker。阳性对照样本在 700 bp 处有清晰条带, 为支原体阳性条带; 阴性对照在 700 bp 处无条带出现, 只在引物二聚体位置有模糊条带; 如果待检测样品在 700 bp 有清晰条带则表明该样品已被支原体污染, 若只在引物二聚体处有模糊条带则说明该样品没有支原体污染, 参见如下图说明:

bp L1 L2 L3 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8



L1: DL2000 marker;

L2: 1N, Negative Control ;

L3: 2P, Positive Control; ,

L4~L11: S1~S8号检测样品, 其中,

S8样品 无支原体感染,

S2和S7轻微感染支原体,

S1、S3、S4、S5、S6感染支原体严重。

三、常见问题

2.1 细胞培养时添加双抗对支原体检测结果有影响吗?

细胞培养时添加的双抗(青、链霉素)对支原体抑制作用非常微弱, 可以直接进行 PCR 检测。为了最大化 PCR 检测信号, 建议在无抗生素条件下培养几天再次检测。

2.2 液氮复苏的细胞能否立即进行支原体检测?

建议复苏后培养 48~72hr, 细胞汇合度达到 70%以上进行检测。

