

Product Datasheet

支原体 PCR 检测试剂盒使用说明书

- 【品名】：支原体 PCR 检测试剂盒
- 【货号】：db20000
- 【规格】：20 Test/盒
- 【有效期】：自检定合格之日起有效期为 24 个月
- 【贮藏】：避光，保存于-20℃

1. 适用范围

本品为 PCR 法支原体检测试剂盒，供体外检测使用。通过检测可以确认各种生物材料（如细胞培养物、实验动物分泌物及动物血清等）是否感染或污染支原体。

注：本试剂盒仅用于研究，不能用于临床诊断。

2. 试剂组分：

- 1) DNA 释放液：820ul (40ul/次) 2) Taq 酶：20ul (1U/次)
- 3) PCR 反应液：400ul (20ul/次) 4) 阳性对照：冻干粉末

3. 样品收集与贮存：

- 1) 收取待检样品（贴壁细胞：细胞生长至 80% 左右即可，送检细胞不能用消化液消化细胞，可以使用细胞刮刀刮取细胞；悬浮细胞：细胞生长至 80% 左右即可），取 150ul（约 $1\sim 3 \times 10^5$ 细胞数）至离心管，10000rpm 离心 5min；
- 2) 将上清弃去留下沉淀，加入 40ul DNA 释放液，混匀，沸水浴 5 分钟；
- 3) 样品用前 10000 转离心 5 分钟，待用。

4. 试剂的配制（请按需现配现用）

- 1) PCR 反应液与 Taq 酶混合、分装，尽量在冰浴及超净工作台中进行。
- 2) DNA 阳性对照准备：开启样品盖前，请先在离心机上甩一下，再加入 25ul 去离子水，使其充分溶解，待用。
- 3) 先从-20℃冰箱中取出 PCR 反应液，按下表配制反应混合液（如检测样品是 3 个，加上阳性对照和阴性对照共配制 5 个反应，取 PCR 反应混合液 100ul，加 5ul Taq 酶）。

	1 个反应体系	5 个反应体系	20 个反应体系
PCR 反应液	20ul	100ul	400ul
Taq 酶	1ul	5ul	20ul

5. 操作程序

- 1) 充分混匀 PCR 反应液和 Taq 酶，并以 21ul/管分装至 PCR 反应管中。
- 2) 每个 PCR 反应管中加入处理好的样品 4ul，阳性对照和阴性对照（4ul DNA 释

液）各加入 4ul/管。

3) PCR 反应管在 10000rpm 离心 10s，使之混匀。

4) 将所有 PCR 反应管放入 PCR 仪，参照以下参数运行 PCR 仪。

- ① 预变性：94℃，3min；
- ② 循环（35 个）：94℃，30sec；55℃，30sec；72℃，45sec；
- ③ 延伸：72℃，7min；完成扩增后，4℃保存。

注：如 PCR 仪无热盖，请在扩增反应前，在 PCR 反应管中加入一滴液体石蜡。

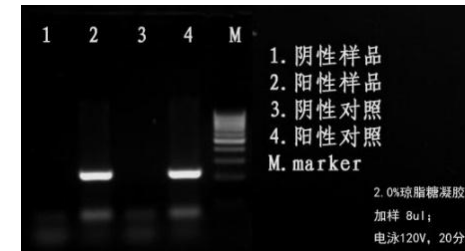
6. PCR 产物的电泳检测

取 8ul PCR 反应液，经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后，在紫外线下观察结果，若出现与阳性对照相同的条带为支原体阳性。

样品是否污染支原体，可根据 PCR 条带的有无进行判断。而根据感染支原体类型的不同，扩增产物大小有所不同，PCR 产物在 200~233bp 之间。

备注：① 制胶：2.0% 琼脂糖凝胶，称取 1.0g 琼脂糖于三角烧杯中，加入 50ml 1×TAE 电泳缓冲液，水浴（或微波炉）融化琼脂糖，稍冷后加入 5ul 10mg/ml 溴化乙锭（EB），注入凝胶模中，冷却凝固后，即可用于电泳。② 电泳：120V 电泳 20 分钟。③ 电泳缓冲液：50×TAE 配方为 242g Tris、57.1ml 冰乙酸、37.2g EDTA. 2H₂O，pH8.5 定容至 1L 即可。

7. 电泳图片：



8. 注意事项

1) 使用本试剂前请仔细阅读本说明书全文。

2) 操作时应尽量少说话，因口腔中也含有支原体，可能引起样品污染，而造成假阳性；整个检测过程中，反应体系的配制、样本处理及加样、PCR 扩增应分区域进行，以避免交叉污染。

3) 实验时，试剂盒组分中的试剂使用前应充分融化并混匀（混匀时禁止激烈振荡，只需要进行上下倒置多次进行混匀）。

4) 反应管中加好所有的试剂后，应尽快上 PCR 仪进行扩增，以免形成过多的二聚体。

5) 细胞培养物中含有青霉素和链霉素等抗生物素不会影响本品的检测结果。如果用户需要进一步提高检测灵敏度，建议细胞在不含青霉素和链霉素等抗生素中进行培养 2-3 天后送样检测。

Product Datasheet

附录: 本试剂盒能扩增的支原体种类参考表

编号	种 类	编号	种 类
1	A. laidlawii	25	Mycoplasma bovis
2	A. granularum	26	Mycoplasma spermatophilum
3	Mesoplasma pleciae	27	Mycoplasma mustelae
4	Mycoplasma arginini	28	Mycoplasma caviae
5	Mycoplasma hyosynoviae	29	Mycoplasma columbinasale
6	Mycoplasma gateae	30	Mycoplasma canis
7	Mycoplasma faucium	31	Mycoplasma hyopharyngis
8	Mycoplasma canadense	32	Mycoplasma fermentans
9	Mycoplasma buccale	33	Mycoplasma hyopneumoniae
10	Mycoplasma orale	34	Mycoplasma edwardii
11	Mycoplasma salivarium	35	Mycoplasma primatum
12	Mycoplasma auris	36	Mycoplasma opalescens
13	Mycoplasma cloacale	37	Mycoplasma zalophi
14	Mycoplasma anseris	38	Mycoplasma pulmonis
15	Mycoplasma phocicerebrale	39	Mycoplasma collis
16	Mycoplasma falconis	40	Mycoplasma mobile
17	Mycoplasma spumans	41	Mycoplasma indiense
18	Mycoplasma sphenisci	42	Mycoplasma verecundum
19	Mycoplasma timone	43	Mycoplasma hyorhinis
20	Mycoplasma subdolum	44	Mycoplasma gallopavonis
21	Mycoplasma alkalescens	45	Mycoplasma anatis
22	Mycoplasma phocirhinis	46	Mycoplasma corogypsi
23	Mycoplasma maculosum	47	Mycoplasma bovirhinis
24	Mycoplasma sp.	48	Mycoplasma sp.