

# GMyc-PCR Mycoplasma Detection Kit (2G)

## 支原体 PCR 检测试剂盒（巢式 PCR）（2G）

### 产品简介

支原体 PCR 检测试剂盒（巢式 PCR）（2G）是基于巢式 PCR 法(Nested PCR)对各种生物材料（如细胞培养物、实验动物分泌物和动物血清等）支原体感染的检测。该试剂盒采用定量 PCR 技术，针对支原体 16S-23S rRNA 序列保守区域设计两套引物，进行两轮 PCR 扩增，以第二轮扩增产物为准进行支原体污染情况判断。其可检出包括口腔支原体(M. orale)、肺炎支原体(M. pneumoniae)、猪鼻支原体(M. hyorhinitis)、精氨酸支原体(M. arginini)、鸡败血支原体(M. gallisepticum)、关节液支原体(M. synoviae)、发酵支原体(M. fermentans)、柠檬螺原体(Spiroplasma citri)、唾液支原体(M. salivarium)等在内的共 34 种支原体，灵敏度可达 2.5 copies/uL，对于 10 CFU/mL 支原体标准菌株也可正常扩增有条带，具备特异性强、灵敏度高、操作方便快捷等特点，可直接用于细胞培养上清液的检测。

本产品相较于常规 PCR 法支原体检测试剂盒，可避免由于引物与模板之间的非特异配对，导致非特异性产物的产生；还可灵敏的检测到样本中微量的支原体 DNA，避免假阴性的产生。

### 产品信息

货号	40614ES10 / 40614ES20
规格	10 assays / 20 assays

### 组分信息

组分编号	组分名称	40614ES10	40614ES20
40614-A <sup>*</sup>	GMyc-1st PCR Mix	460 μL	460 μL × 2 管
40614-B <sup>*</sup>	GMyc-2nd PCR Mix	490 μL	490 μL × 2 管
40614-C <sup>**</sup>	Positive Control Template	20 μL	40 μL

<sup>\*</sup>PCR 反应极其灵敏，为防止假阳性，加样时，最后加阳性对照。

<sup>\*\*</sup>40614-C: Positive Control Template, 阳性对照。

### 运输和储存条件

干冰运输，-25~-15℃保存，有效期 1 年。

<sup>\*</sup>整个试剂盒若较长时间不用，请避光保存。其中 40614-C 长期不用时，可-85~-65℃冷冻保存。

### 使用说明

#### 1. 实验前准备

##### 1) 提前准备实验所需试剂耗材：

如：琼脂糖凝胶、电泳缓冲液、DNA marker 等试剂和移液枪、无菌吸头、离心管等耗材。

##### 2) 自备实验所需设备和仪器：

如：漩涡振荡器、PCR 仪、微量离心机、电泳仪等。

#### 2. 实验方法

### 1) 待测样本类型:

- 本试剂盒可以直接检测细胞上清、血清和培养基，以及细胞 DNA 等。细胞培养 3-6 天后，直接取其上清液进行 PCR 反应。为排除细胞培养基抑制 PCR 反应，阳性对照中需加入等量的细胞上清液。
- 对于细胞悬液类样本，则需要先经过样本前处理，提取总 DNA 后，才可进行检测。

### 2) 实验结果判读:

本试剂盒需要进行两轮 PCR 反应：第一轮 PCR 结束后，取其反应产物作为第二轮 PCR 的模板，根据两轮 PCR 产物电泳条带之有无及片段大小来分析结果（第一轮阳性对照 PCR 条带大小为 389bp、第二轮阳性对照 PCR 条带大小为 247bp）。其中，应以第二轮扩增产物结果为准，进行有无支原体污染的判断。

### 3) 第一轮 PCR:

- 充分融解 GMyc-1st PCR Mix (40614-A)，按下列表格配制反应液:

试剂	阴性对照	实验组	阳性对照
GMyc-1st PCR Mix (40614-A)	46 $\mu$ L	46 $\mu$ L	46 $\mu$ L
待测样本	/	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Positive Control Template (40614-C)	/	/	1 $\mu$ L

表 1 第一轮 PCR 反应体系

\*为防止 40614-C 污染，请先将阴性对照组和实验组加样完成后，再将 40614-C 加入阳性对照组。

- 按下述条件进行 PCR 反应:

#### 普通程序

94°C	5 min	
94°C	30 sec	} 30 cycles
62°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	

#### 快速程序

95°C	5 min	
95°C	15 sec	} 26 cycles
60°C	30 sec	

\*快速程序能够缩短反应时间，但对于灵敏度会略有影响，可自行选择使用普通程序或者快速程序。

### 4) 第二轮 PCR:

- 充分融解 GMyc-2nd PCR Mix (40614-B)，按下列表格配制反应液:

试剂	阴性对照	实验组	阳性对照
GMyc-2nd PCR Mix (40614-B)	49 $\mu$ L	49 $\mu$ L	49 $\mu$ L
1st PCR 反应液 (10 倍稀释液)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L

表 2 第二轮 PCR 反应体系

\*第一轮 PCR 反应液需经 10 倍稀释后，方可作为第二轮 PCR 的模板。

b. 按下述条件进行 PCR 反应：

### 普通程序（总时长 90min）

94°C            5 min

94°C            30 sec }  
62°C            30 sec } 30 cycles  
72°C            30 sec }

72°C            7 min

### 快速程序（总时长 48min）

95°C            5 min

95°C            15 sec }  
60°C            30 sec } 26 cycles

\*快速程序灵敏度为 5copies/μL，普通程序灵敏度为 2.5 copies/μL,可以根据需要切换程序，常规情况推荐普通程序，且不同程序的循环数不请严格按照说明书进行。

c. 反应结束后，取 7~10 μL 的 PCR 反应液（无需加 Loading Buffer），直接进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物”。

\*以本轮（即第二轮）扩增产物为准进行支原体污染情况判断。

\*\*根据 PCR 产物电泳条带之有无及片段大小来分析结果（第二轮阳性对照 PCR 条带大小为 247bp）。

### 5) 本试剂盒的推荐使用频率：

检测场景	推荐的检测频率
新细胞进入实验室	必检
液氮保存前	必检
定期常规	每月检测一次
发现污染后	每周检测一次
发现细胞异常	随时检测

### 注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。