

Code No. 6601

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Mycoplasma
Detection Set

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备材料	1
● 试剂盒原理	1
● 使用前提示	2
● 注意事项	2
● 操作方法	3
● 应用例	5
● Q&A	5
● 参考文献	5
● 关联产品	5

● 制品说明

本制品是检测培养细胞等生物材料中支原体的Primer Sets。常规培养法进行支原体检出需要一周时间，使用本Kit通过PCR扩增及电泳分析进行支原体检出只需数个小时，操作方便简单。使用本Kit能检出几种不同种类的支原体（*M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum*）以及尿素原体（*Ureaplasma*）属中的1种（*U. urealyticum*）。当与TaKaRa Taq™或TaKaRa Ex Taq®结合使用，可以获得更好的扩增效果。

● 制品内容 (50 μl × 100 次量)

1. MCGp F1 Primer (20 pmol/ μl)	50 μl
2. MCGp R1 Primer (20 pmol/ μl)	50 μl
3. MCGp F2 Primer (20 pmol/ μl)	50 μl
4. MCGp R2 Primer (20 pmol/ μl)	50 μl
5. Control Template (1 ng/ μl)	50 μl

● 保 存: -20°C。

● 试剂盒外必备材料

[Reagents]

1. TaKaRa Taq (Code No. R001A/B/C) 或 TaKaRa Ex Taq (Code No. RR001A/B/C)
2. 琼脂糖凝胶
例如: Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/B), PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
3. 灭菌水

[Equipment]

1. PCR 扩增仪
2. 微量离心管
3. 琼脂糖凝胶电泳装置
4. 微量离心机
5. 移液枪及枪头 (灭菌)

● 试剂盒原理

原核生物的rRNA碱基序列非常保守,而rRNA操纵子上编码rRNA的DNA间隔区如16S和23S间隔区,各种生物种间的碱基序列差别很大。这个间隔区的DNA序列及长度在*Mycoplasma*各个种间既有相对保守的部分,也有具有很大差异的部分。本制品是在编码16S和23S rRNA的DNA上设计一对F1/R1引物,扩增编码16S和23S rRNA的DNA间隔区,然后在编码16S和23S rRNA的DNA间隔区的保守区上设计一条F2引物,在编码23S rRNA的DNA上设计一条R2引物进行套式PCR。此反应体系只特异性扩增*Mycoplasma* DNA,检出灵敏度与特异性都很高。表1中包括本Kit中的4条引物序列及与之相对应的12种*Mycoplasma*的16S-Spacer-23S区域中的序列。

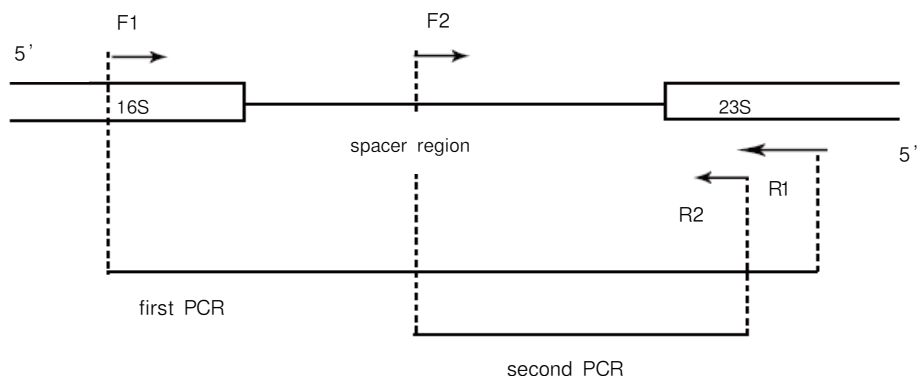


图 1. PCR 方法检测 *Mycoplasma* 原理

	F1 5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3'	R1 5' CTCTATCGAC TTT CAGA-CCCAAGGCAT 3' T C	F2 5' GTCTTTGAAAAGCTGAAT 3'	R2 5' GCATCCACCAAAAAGCTCT 3' T T
<i>M. fermentans</i>A.....TC·A.....
<i>M. hyorhinis</i>T.....	...A.....TA·T.....
<i>M. orale</i>T.....T	A.....A·A.....
<i>M. hominis</i>T.....TA·A.....
<i>M. salivarium</i>T.....TA·A.....
<i>M. arginini</i>A.....CA·A.....
<i>M. capricolum</i>A·T.....	...T·G·C·TTTTT...T·G·...
<i>M. arthritis</i>A.....CA·A.....
<i>M. neurolyticum</i>T.....	...A.....C	A.....T·T·T.....
<i>M. pulmonis</i>T.....C	...A.....T·C·T.....
<i>M. hyopneumoniae</i>T.....	·C·A.....T	·C·...·C·...A·T.....
<i>U. urealyticum</i>	·A·T.....	...A·C·GTTT·T	·A·.....	...T...T·AG...
<i>E. coli</i>T·G·T·G·C	...A·C·CTG·CT·G·G·...GTGT·G·...
<i>B. subtilis</i>	...C·A·T·T·C	...A·G·CCT·T·G·...AG·...GTGCG·C·...

表 1. Primer 序列及与之相对应的 *Mycoplasma* DNA 序列。

圆点 (·) 表示与引物序列相同的碱基。

(-) 表示不含 primer 的碱基序列。

● 使用前提示

该试剂盒设计用于检测支原体 DNA，也可以检测非活菌。

在某些情况下，当在试剂盒中的引物所覆盖的序列中发生突变或缺失/插入时，无法检测到支原体 DNA。

(Takara Bio 对本产品的分析结果不承担任何责任。)

● 注意事项

本试剂盒中使用的巢式 PCR 反应是一种非常灵敏的扩增方法。

注意避免 PCR 产物和对照模板的交叉污染。建议通过检测，指定和物理隔离反应混合物制备的工作区域。

● 操作方法

用于检测 *Mycoplasma* 的样品是接种后进行 3-6 天细胞培养的培养上清液。

如果使用 Eagle 等常用的细胞培养基时，培养上清可直接加入到 PCR 反应液中。如果使用细胞悬浊液作为样品，则需要提取 DNA，再进行 PCR 反应。如果材料中含有 PCR 反应阻碍物，建议对 DNA 进行抽提，再添加到 PCR 反应液中。为了确认样品中是否有反应阻碍物，在样品中加入 Control Template，进行正对照反应。（参照 D. Control 实验）

A. 1st PCR反应

1. 按以下的顺序配制反应混合液。

试剂	用量
灭菌水	34.75~39.25 μ l
10 \times PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
MCGp F1 Primer	0.5 μ l
MCGp R1 Primer	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> 或 <i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l

2. 向以上反应混合液中加入检测样品（5 μ l以下），使总体积达到50 μ l。添加样品时防止交叉污染。
3. 把反应管放入Thermal Cycler中，设定以下条件，进行PCR反应。

94°C	30 sec.	1 cycle
94°C	30 sec.	} 30-35 cycles
55°C	2 min.	
72°C	1 min.	

B. 2nd PCR反应

1. 按照以下顺序配制反应混合液。

试剂	用量
灭菌水	39.25 μ l
10 \times PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
MCGp F2 Primer	0.5 μ l
MCGp R2 Primer	0.5 μ l
<i>TaKaRaTaq</i> 或 <i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l

2. 向以上反应混合液中小心加入0.5 μ l 1st PCR反应产物，注意防止交叉污染。
3. 把反应管放入Thermal Cycler中，设定以下条件，进行PCR反应。

94°C	30 sec.	1 cycle
94°C	30 sec.	} 30 cycles
55°C	2 min.	
72°C	1 min.	

C. 扩增产物进行电泳分析

1. 反应结束后，取1st及2nd PCR的反应产物各10 μl，进行电泳。
2. 进行琼脂糖凝胶电泳，确认扩增片段的有无以及片段大小。例如1st PCR产物使用1%的琼脂糖凝胶（如Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/B)）进行分析，2nd PCR产物使用2~4%的PrimeGel Agarose (CodeNo. 5810A) 进行分析。

* : 表2是以12种*Mycoplasma* DNA分别作为模板，2对引物进行扩增所得到的片段大小。

表2. 12种*Mycoplasma*属的扩增片段大小

种 属	引 物	
	F1 和 R1 (bp)	F2 和 R2 (bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. pulmonis</i>	477	189
<i>M. hyorhinae</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. capricolum</i>	415	179
<i>M. arthritidis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370, 369	147, 148
<i>M. arginini</i>	369	145
<i>U. urealyticum</i>	482, 481	154

D. Control实验

为了确认样品中是否含有PCR反应阻碍物，需要添加Control Template进行正对照反应。在对照实验中，样品（或细胞培养物）需要与所提供的0.5 μl Control Template同时进行PCR反应。

使用Control Template时，F1和R1引物扩增产物是810 bp、F2和R2引物扩增产物是590 bp。

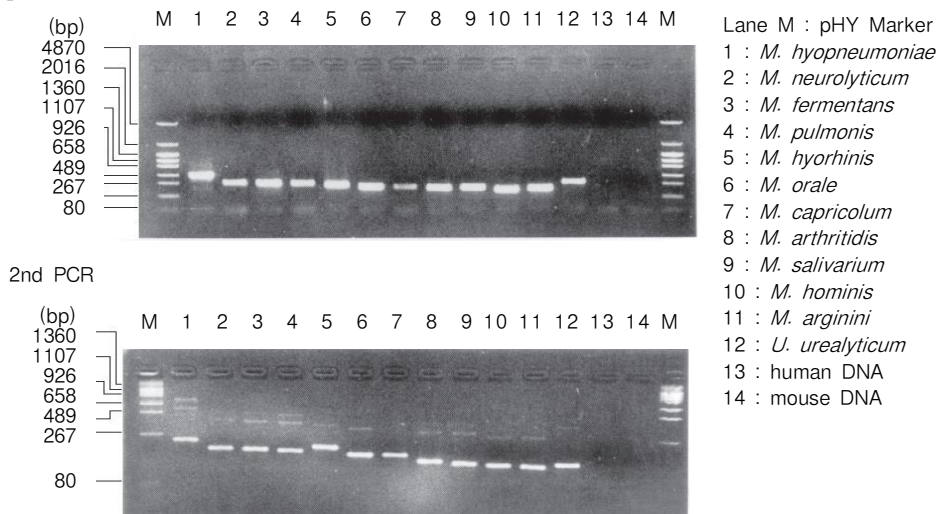
- 【注意】
1. 如果Control Template无片段扩增，说明检测样品中有阻碍物，建议将检测样品进行DNA提取，再以其作为模板进行扩增。
 2. Control Template是用于检测PCR反应性能的。当加入Control Template时，即使检测样品中含有*Mycoplasma*，也可能没有扩增获得与*Mycoplasma*相对应的片段，因此不要使用Control Template添加的反应进行样品的结果判定。为了获得准确的样品检测结果，在做PCR反应时，要保证检测样品是唯一的模板。
 3. 当检测样品中含有大量*Mycoplasma*时，有可能只有样品中*Mycoplasma*的片段扩增，而正对照的Control Template片段却没有扩增。
 4. 对照模板不含任何*Mycoplasma*序列。

● 应用例

(PCR 检测 11 种 *Mycoplasma* 和 1 种 *Ureaplasma* 的结果)

分别提取 11 种 *Mycoplasma* 和 1 种 *Ureaplasma* 的 DNA, 取约 1 ng 进行套式 PCR, 反应体积为 100 μ l, 同时使用 Human DNA 和 Mouse DNA 进行 PCR 反应作为负对照。

【结果】 1st PCR



1st PCR 的检测下限是 *M. capricolum* 1 ng, *M. hyopneumoniae* 和 *U. urealyticum* 100 pg、其他的 *Mycoplasma* 是 10 pg。但是 Human DNA、Mouse DNA 在 100 ng 时有非特异性片段扩增。

2nd PCR 的检测下限是 *M. capricolum* 和 *M. hyopneumoniae* 100 fg, 其他的 *Mycoplasma* 10 fg。另外, Human DNA、Mouse DNA 在 100 ng 时没有非特异性片段扩增。

● Q&A

Q-1. 想以培养液的上清作为检测样品, 可以使用何种培养基?

A-1. 使用 *TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Taq* 确认获得如下结果:

- (1) 使用含有 10% FCS 的 DMEM、RPMI 培养基, 接种后进行 3~6 天的细胞培养, 上清液可以按反应体系 1/10 的量直接添加到 PCR 反应液中, 经确认可以扩增 *Mycoplasma* DNA。
- (2) 已确认 FCS 原液按反应体系 1/10 的量直接添加到反应液中不会阻碍 PCR 反应。

Q-2. 本制品能检测人肺炎的 *M. pneumoniae* 吗?

A-2. 不能。

● 参考文献

Uemori, T., Asada, K., Kato, I., and Harasawa, R. System. *Appl. Microbiol.* (1992) 15:181-186.

● 关联产品

*TaKaRa Taq*TM (Code No. R001A/B/C)

*TaKaRa Taq*TM Hot Start Version (Code No. R007A/B)

TaKaRa Ex Taq[®] (Code No. RR001A/B/C)

TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (Code No. RR006A/B)

CycleavePCRTM *Mycoplasma* Detection Kit (Code No. CY232)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

TaKaRa Taq , PrimeGel, and CycleavePCR are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>