

支原体 PCR 检测试剂盒使用说明

一、概要

上海瑾原生物技术有限公司生产的支原体 PCR 检测试剂盒主要用于检测实验室细胞株感染支原体的检测。具体检测流程由快速基因组抽提、PCR 样品准备、PCR 程序、琼脂糖电泳、凝胶成像、结果判读六个部分组成。

50 次试剂盒提供的试剂材料如下：

试剂材料名称	货号	剂量	保存温度
核酸抽提试剂 A 液	JY-H023-组份 A	5 mL	4°C
核酸抽提试剂 B 液	JY-H023-组份 B	5 mL	4°C
核酸洗脱缓冲液	JY-H023-组份 D	1.5 mL	4°C
核酸纯化柱	JY-H023-组份 C	50 个	常温
收集管	JY-H023-组份 E	50 个	常温
PCR 预混工作液（含染料，客户可自行分装）	JY-H023-组份 F	770 μ L	-20°C
阴性对照	JY-H023-组份 G	300 μ L	-20°C
支原体阳性对照（客户可自行分装）	JY-H023-组份 H	300 μ L	-20°C

用户需要准备的设备与器材包括：生物安全柜（或超净工作台，不开风机）、高速离心机（或者转速可达 8000 rpm 的掌上离心机）、水浴锅、PCR 仪、天平、微波炉、电源、核酸水平电泳仪（含电泳槽）、核酸成像仪、移液枪、锥形瓶、水漂、尖头、PCR 管、1.5 mL EP 管、透明胶带、手套、纸巾、剪刀、长柄镊子。

用户需要准备的试剂包括：核酸电泳缓冲液（50xTAE）、GelRed DNA 染料、DNA Marker（含染料）、琼脂糖、纯水。

二、快速基因组抽提

1. 开启水浴锅，升温至 100°C，内置耐高温水漂。
2. 开启 PCR 仪预热。
3. 用 1.5 mL EP 管收集细胞上清约 1 mL，标注细胞名称，用透明胶带封住标注的名称，以免水浴时被水褪色。
备注：细胞上清通常取培养过夜（16h 以上）的细胞上清。获取的细胞上清需当日检测，不要放冰箱过夜。
4. 每管细胞上清中加入 100 μ L 核酸抽提试剂 A 液，用镊子夹 EP 管，置 100°C 水浴锅的水漂上，煮 3-5 min
5. 取出煮过的 EP 管，加入核酸抽提试剂 B 液 100 μ L。关闭水浴锅。
6. 将核酸纯化柱套入收集管，在收集管上标注细胞名称，将混合液转移至核酸纯化柱，加盖，该套装名为核酸纯化离心管。

7. 高速离心机对称放置核酸纯化离心管，10000 rpm 离心（转速达到 10000 rpm 即可关机），弃去收集管中的液体，再将细胞上清混合液继续转移至核酸纯化柱，加盖，离心，弃去收集管内液体。反复几次，直到细胞上清混合液全部转移并富集到核酸纯化柱内。
8. 向核酸纯化柱中央的膜上加入 30 μL 核酸洗脱缓冲液，关闭的水浴锅内还有余热（60 $^{\circ}\text{C}$ 左右），将核酸纯化离心管在热水的水漂上静置 2min，取出核酸纯化离心管，将核酸纯化柱转移至新的 1.5mL EP 管中，剪刀剪去核酸纯化柱的盖子，盖 1.5 mL EP 管的盖子，方便后续离心。在带有核酸纯化柱的 1.5mL EP 管壁上标注细胞名称。弃去收集管。
9. 高速离心机对称放置带有核酸纯化柱的 1.5 mL EP 管，10000 rpm 离心（转速达到 10000 rpm 即可关机），1.5 mL EP 管内的液体即为洗脱下来的浓缩的核酸基因组 DNA 样品。

三、PCR 样品准备

1. 将带有核酸纯化柱的 1.5mL EP 管转移至生物安全柜（或超净工作台，不开风机），弃去核酸纯化柱。

2. 取 8 联 PCR 管（也可使用 PCR 单管），管壁上标注细胞名称，用移液枪加入以下溶液：

每管总体积 20 μL

(1) 阳性对照	(2) 阴性对照	(3) 样品
PCR 预混工作液 15 μL	PCR 预混工作液 15 μL	PCR 预混工作液 15 μL
支原体阳性对照 5 μL	阴性对照 5 μL	核酸基因组 DNA 样品 5 μL

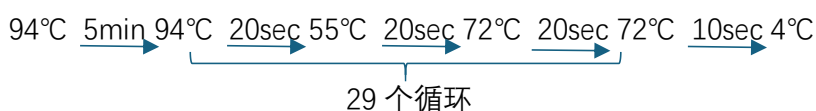
备注：PCR 预混工作液由 Taq 酶、PCR 缓冲液、dNTP、支原体上下游引物、电泳 Loading 缓冲液组成。

3. 上述溶液一般按照剂量多的先加入管内，剂量少的后加入管内，同一剂量的溶液一起加，避免反复调整移液枪量程。加完上述溶液后，盖上 PCR 8 联管盖（或单管 PCR 管盖），压紧。
4. 将剩余的 PCR 预混工作液、支原体阳性对照、超纯水放回-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，核酸抽提试剂 A 液，核酸抽提试剂 B 液，放回 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，收集管与核酸纯化柱常温保存，以后还可继续使用。

四、PCR 运行

1. PCR 仪打开盖子，将 PCR 8 联管或 PCR 单管放入在开启的 PCR 仪金属盘上，盖紧 PCR 仪盖子。选择适用的 PCR 程序，运行 PCR 程序。

PCR 程序：48min



2. 运行结束后，打开 PCR 仪盖子，取出 PCR 8 联管或 PCR 单管。
3. 按 PCR 仪关机程序关闭 PCR 仪。

五、琼脂糖电泳

1. 在 PCR 仪运行过程中开始制备琼脂糖凝胶。
2. 取一张合适的干净纸，放在电子天平称量台上，打开 I/O 开关，显示 0。
3. 将琼脂糖粉加在干净纸上，称约 0.24 g。常用琼脂糖称量可按下表：

小胶 30 mL 琼脂糖 0.24 g 终浓度 0.8%

中胶 60 mL 琼脂糖 0.48 g 终浓度 0.8%

大胶 100 mL 琼脂糖 0.8 g 终浓度 0.8%

将称量好的琼脂糖倒入锥形玻璃瓶，加入对应剂量的 1xTAE，松盖玻璃瓶盖子，放入微波炉。

4. 点击微波炉的杀菌按钮和开启按钮，加热 1min，打开微波炉门，略停顿几秒，关闭微波炉门，再次点击微波炉的杀菌按钮和开启按钮，加热 1min。（分两次加热，以防琼脂糖爆沸）。
5. 用纸包住锥形玻璃瓶颈，将玻璃瓶移出微波炉，加入 GelRed DNA 染料。30mL 胶加 3 μ L GelRed DNA 染料；60mL 胶加 6 μ L GelRed DNA 染料；100mL 胶加 10 μ L GelRed DNA 染料。轻轻混匀，不要有气泡。
6. 在筑胶槽内放入胶板和胶梳，将热琼脂糖倒入筑胶槽的胶板上，室温放置至凝固，加少量 1xTAE 缓冲液润湿凝胶表面，拔出胶梳，将胶板转移至装有 1xTAE 缓冲液的电泳槽内，使 1xTAE 缓冲液盖过凝胶孔，凝胶孔朝向电泳槽阴极（黑色）。
7. PCR 运行完毕，从 PCR 仪内取出 PCR 8 联管（或 PCR 单管）。
8. 取 2 μ L DNA Marker（含染料）与 8 μ L 1xTAE 缓冲液混合，将混合液加至凝胶孔内。
9. 取 10 μ L PCR 样品依次加入凝胶孔内。
10. 加样完毕后，盖好电泳槽上盖，开启电泳仪，130 V 恒压电泳 15-20min，关闭电泳仪。

六、凝胶成像

1. 打开电脑，打开凝胶成像仪。
2. 电脑桌面点击成像仪图标，点击摄像头图标。
3. 打开成像仪抽屉，放入电泳过的胶板，将胶板上的琼脂糖推入成像仪抽屉台面，凝胶孔朝向抽屉里面。
4. 关闭抽屉，点亮成像仪的 UV 按钮，即可在电脑界面显示图像，可点击界面右侧的放大或缩小按键，将图像调整到显示窗口里，也可打开成像仪抽屉，手动调整凝胶位置。
5. 按界面的保存按钮，保存图像至设定文件路径。
6. 取出成像仪抽屉里的凝胶，弃去，用纸巾将台面擦拭干净。

七、结果判读

1. 将保存的图像在 PPT 里编辑，依次对每个加样孔标注上 Marker、阳性、阴性、细胞名称。

2. 由于不同细胞株可能被不同来源的支原体感染，阳性扩增条带通常可能出现在 100 至 500bp 区间

3. 发送截图报告。收拾操作台面，丢弃垃圾，关闭不使用的设备电源。

注意：本产品仅供科学研究使用，不适用于人、动物的诊断程序，