

BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0305S	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	25次
C0305M	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒(BeyoColor™ Mycoplasma Colorimetric LAMP Assay Kit), 是一种通过环介导等温扩增(Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)法扩增支原体DNA并通过反应体系的颜色变化检测培养的细胞等生物材料中是否有支原体污染的试剂盒。本试剂盒采用了dU掺入和UDG酶防止等温扩增产物污染技术, 可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染, 并且采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。
- 支原体(Mycoplasma)是最小、最简单的原核生物。支原体有如下特征: 支原体无细胞壁结构, 所以针对细胞壁的许多常见的抗生素, 如青霉素或β-内酰胺类抗生素对支原体无效; 支原体大小介于细菌和病毒之间, 约为0.2-0.8μm, 所以部分支原体可通过0.22μm滤器, 常规的过滤对支原体无效; 很多支原体由于自身的生物合成能力有限而依靠宿主提供营养, 所以通常吸附或散落在细胞表面和细胞之间。支原体的这些特征使细胞培养过程中存在支原体污染的风险, 细胞的支原体污染已经成为一个世界性的普遍问题[1]。
- 支原体污染可能会严重影响细胞的状态, 使细胞的基因表达、代谢特征发生变化, 导致细胞生长减缓、分化和死亡异常, 严重影响细胞功能。这些影响因素会严重影响实验结果的可靠性、可重复性和一致性, 因此支原体污染的检测非常重要。
- 细胞培养过程中的细菌、酵母或霉菌污染在光学显微镜下可见, 但支原体污染在光学显微镜下通常不可见, 必须通过特定的检测方法进行检测。检测支原体污染的常用方法有支原体分离培养、ELISA、发光法、普通巢式PCR法、qPCR等生化检测以及DNA荧光染色检测等。上述检测方法中, 支原体分离培养法操作步骤相对比较烦琐、ELISA灵敏性和特异性不高, 普通巢式PCR法所需时间较长并且需要开盖电泳, qPCR法和发光法需要特殊的仪器, 而等温扩增法只需一定的恒温反应, 并且通过颜色变化而无需电泳分析即可确定是否有支原体污染。
- 等温扩增技术(Isothermal amplification technology)是核酸体外扩增技术, 其反应过程始终维持在一定的恒定温度下, 通过添加不同活性的酶和各自特异性引物进行核酸的快速扩增[2]。本试剂盒采用的是环介导核酸等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 其特点是针对靶基因的不同区域设计4-6条特异引物, 使用链置换DNA聚合酶(Bst DNA Polymerase)启动DNA的合成, 形成哑铃状互补链, 并进一步通过连续链置换进入循环扩增阶段, 扩增的最后产物是具有不同个茎环结构、多环花椰菜样结构的DNA的混合物。LAMP仅需在等温条件下(如60-65℃)保温30-60分钟, 即可完成核酸扩增反应。与常规PCR相比, LAMP不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程, 具有简单、快速、灵敏度高、特异性强等特点[3]。
- **本试剂盒灵敏度高, 反应时间短。**本试剂盒的灵敏性比传统的PCR方法高2-5个数量级, 通过阳性质粒计算检测下限约为20-200 copies/μl。且仅需1个小时就能完成检测反应。
- **本试剂盒特异性强、支原体种类适用性广。**本试剂盒根据支原体的16S rRNA保守基因组序列, 设计了多条特异性LAMP引物, 可直接以细胞培养上清或血清等生物材料为模板进行检测。本试剂盒可以扩增约45种支原体, 细胞污染常见的支原体种类都可以检测出。本试剂盒只扩增支原体DNA, 对细菌、真菌、真核细胞的DNA不扩增。
- **本试剂盒采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。**本试剂盒优化了指示剂染料, 支原体DNA片段被快速大量扩增后, 反应管内液体的颜色由紫罗兰或蓝紫色变成天蓝色或深天蓝色即为支原体阳性。

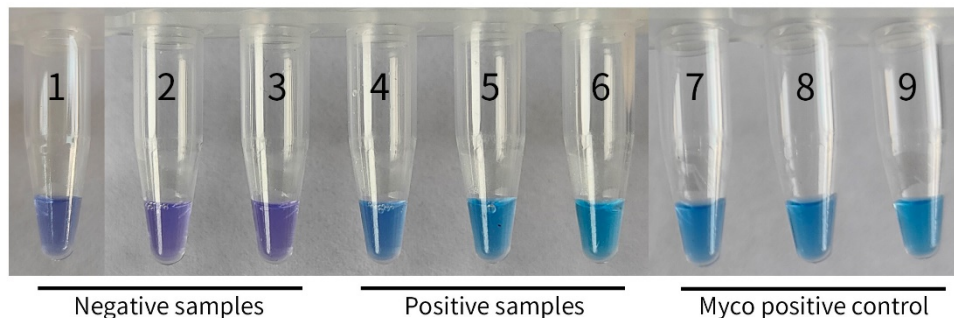


图1. 碧云天BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒(C0305)的检测效果图。1-3为阴性样品, 其中1号为Nuclease-free Water, 2号为未经细胞培养的DMEM, 3号为经过细胞培养的DMEM上清; 6号为支原体阳性的DMEM上清样品原液, 4号和5号分别为6号稀释100倍和10倍后的样品; 9号为Myco Positive Control, 7号和8号分别为Myco Positive Control稀释100倍和10倍后的样品。本图仅供参考, 不同批次的产品, 阴性和阳性的颜色可能会与本图略有差异, 实际检测时阳性和阴性相比有明显的

颜色变化即可。

- **本试剂盒采用防污染技术,有效避免污染。**本试剂盒使用了dU和热敏型UDG酶,可以使扩增产物中掺入dU并且在等温扩增前30°C孵育5-15分钟可有效消除等温扩增过程中带来的产物污染问题。在进行等温扩增时,热敏型UDG酶会被失活,从而不会干扰后续的等温扩增检测。
- 本试剂盒可直接检测疑似支原体污染的样品,无须单独提取DNA。
- 如果发现有支原体污染,建议更换无污染的培养细胞进行培养。如果有必要预防或去除支原体,可使用专用的支原体预防或去除试剂,如支原体清除试剂(C0288)、支原体清除试剂Plus (C0290)、支原体预防去除试剂I (C0292)、支原体预防去除试剂II (C0293)、Mycy-Zero™支原体去除试剂(C0280)、Mycy-Zero™ Plus支原体去除试剂(C0285)。
- 本试剂盒提供了阳性对照Mycy Positive Control,可用于确定试剂盒是否能正常工作。Mycy Positive Control不含支原体,无支原体污染风险。建议每次检测都设置阳性对照。
- 本产品如果用于常规的20µl反应体系,小包装可以进行25次检测,中包装可进行100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0305S-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	250µl
C0305S-2	Bst DNA Polymerase	25µl
C0305S-3	Mycy Positive Control	50µl
C0305S-4	Nuclease-free Water	200µl
C0305S-5	Mineral Oil	500µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0305M-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	1ml
C0305M-2	Bst DNA Polymerase	100µl
C0305M-3	Mycy Positive Control	200µl
C0305M-4	Nuclease-free Water	1ml
C0305M-5	Mineral Oil	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存,一年有效。其中LAMP Master Mix with UDG (2X)需避光保存。尽量避免反复冻融。

注意事项:

- 使用前需确保试剂完全融化,上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- 经测试,本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响,但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- 等温扩增是超高灵敏度的检测,请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。等温扩增反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。尽管本试剂盒采用UDG酶防污染技术,但请仍勿打开PCR管盖,等温扩增产物宜密封后按扩增后产物要求处理,以避免超高浓度的扩增产物由于气溶胶等因素污染实验环境。
- 本产品含颜色指示剂,未进行反应前,如果加入样品后颜色和阴性、阳性颜色有明显差异,则需要稀释样品或者使用DNA提取试剂盒处理样品,或者需要适当调整样品的pH至接近中性。
- 本试剂盒可以检测出细胞污染的常见支原体种类,对于少数怀疑可能有不能鉴定的支原体种类污染的、比较重要的细胞,推荐使用碧云天Mycy-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(C0297/C0298)进行双重检测。严格的支原体检测,需使用两种以上不同原理的方法同时检测,才能更有效地避免假阳性和假阴性。
- 本等温扩增体系需要高浓度的二价离子,样品中不能含有高浓度的EDTA等金属离子螯合剂。
- 建议使用带滤芯的吸头配制等温扩增体系,可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 移液枪需要配制专用的,避免和细胞房的混用。使用后用DNA清除试剂处理,推荐RNase, DNase, RNA and DNA Away(R0127)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂:

- 水浴锅或者普通PCR仪。
- DNase-free的带滤芯吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638), 0.2ml PCR管(FTUB322/FTUB323)。

2. 样本准备:

可用于检测支原体污染的样品:细胞培养液、血清、细胞接种后培养了3-6天的培养上清液等。如使用细胞悬液做样品,则需要200×g

离心5分钟后，取上清。**注1：**青霉素和链霉素对PCR反应无抑制作用。**注2：**样品加入量一般为反应体系1/10的量或更少。**注3：**如果样品不能及时检测，可以置于-20℃或者-80℃保存，可放置1-2个月。

3. LAMP反应体系的设置：

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置LAMP反应体系(以每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、阴性对照(Negative Control)或阳性对照(Positive Control)。Negative Control可使用未培养细胞的培养液或Nuclease-free Water, Positive Control可使用Myco Positive Control或确定的其它支原体样品。建议每次检测都设置Negative Control和Positive Control。

注1：LAMP反应体系配制的实验室，与样品前处理、加阳性对照、样品的房间最要好分开，避免出现假阳性。

Reagent	Volume
LAMP Master Mix with UDG (2X)	10μl
Nuclease-free Water	7μl
Template	2μl
Bst DNA Polymerase	1μl
Total Volume	20μl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- 如果使用含热盖的PCR仪，可直接开始反应；如果使用水浴锅反应，每管需要添加20μl Mineral Oil以防止水份蒸发至管盖，影响反应效果。

4. 反应条件：

- 37℃水浴或PCR仪反应5-10分钟，通常就可以有效去除反应体系内容可能的本试剂盒等温扩增产物造成的环境污染。**说明：**初次进行检测时无需进行本步骤；确定从未打开等温扩增反应体系管盖的情况下，也无需进行本步骤；仅当本试剂盒的的扩增产物可能污染检测环境的时候，需要执行本步骤。
 - 后续如果使用水浴锅反应，应提前使温度上升至61℃，然后放入带浮漂的反应管，水浴45分钟。水浴锅的温度波动需要尽量控制在1℃以内。
 - 后续如果使用PCR仪反应，按照“61℃，45分钟；4℃，forever；热盖温度，105℃”设定程序。
- 注：**经过实际测试，温度为61-63℃均可，但61℃效果更好。

5. 结果判断：

取出反应管，室温放置，以白色为背景，观察颜色变化。如果显示紫罗兰或蓝紫色，为阴性；如果显示天蓝色或深天蓝色，则为阳性。具体显色效果可参考图1。

注1：如果样品中模板量比较多，在35-45分钟时即可出现颜色变化；如果样品中模板量比较少，需将反应适当延长至总计50-55分钟。如果延长后，仍然没有变色，即为阴性。延长后，阴性也可能变色，出现假阳性。

注2：反应后，切勿开盖。等温扩增的产物非常多，气溶胶等因素很容易污染实验环境。判断结果后，密封后按实验室废弃物处置要求进行处理。如果确需开盖进行后续的分析检测，建议在相对隔离的其它实验室内操作。

附录：

本试剂盒可以扩增的支原体种类：

种属	种属	种属
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma mobile</i>
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	<i>Mycoplasma edwardii</i>	<i>Mycoplasma neurolyticum</i>
<i>Mycoplasma agassizii</i>	<i>Mycoplasma felifaucium</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma gallinarum</i>	<i>Mycoplasma pirum</i>
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	<i>Mycoplasma procyoni</i>
<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Mycoplasma pullorum</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma hyopharyngis</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
<i>Mycoplasma canadense</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Mycoplasma caviae</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i>	<i>Mycoplasma simbae</i>
<i>Mycoplasma citelli</i>	<i>Mycoplasma iners</i>	<i>Mycoplasma spermatophilum</i>
<i>Mycoplasma cloacale</i>	<i>Mycoplasma lagogenitalium</i>	<i>Mycoplasma sphenisci</i>
<i>Mycoplasma columbina</i>	<i>Mycoplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>
<i>Mycoplasma cricetuli</i>	<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	<i>Mycoplasma testudineum</i>
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	<i>Mycoplasma moatsii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

注：黑标的为细胞培养过程中最常见的种类。

参考文献：

1. Rawadi G, Dussurget O. prokaryotes, 1995, 20: 20.
2. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Chem Rev. 2015. 115(22):12491-545.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Nucleic Acids Res. 2000. 28(12):E63.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0280S	Myco-Zero™支原体去除试剂	5次
C0280M	Myco-Zero™支原体去除试剂	20次
C0280L	Myco-Zero™支原体去除试剂	100次
C0283-500ml	Myco-Zero™支原体去除喷雾	500ml
C0283-2L	Myco-Zero™支原体去除喷雾	2L
C0285S	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	10次
C0285M	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	50次
C0285L	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	200次
C0288S	支原体清除试剂	20mg
C0288M	支原体清除试剂	100mg
C0290S	支原体清除试剂Plus	10mg
C0290M	支原体清除试剂Plus	50mg
C0292-2ml	支原体预防去除试剂I	2ml
C0292-10ml	支原体预防去除试剂I	10ml
C0293-2ml	支原体预防去除试剂II	2ml
C0293-10ml	支原体预防去除试剂II	10ml
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
C0297S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	20次
C0297M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	100次
C0298S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	20次
C0298M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	100次
C0299S	Myco-Lumi™发光法支原体检测阳性对照	20次
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次
C0303S	支原体qPCR检测试剂盒	100次
C0303M	支原体qPCR检测试剂盒	500次
C0305S	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	25次
C0305M	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	100次
FTUB322	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包
FTUB323	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包,10包/箱

Version 2023.12.05