Tehran Cavosh Clon
Our Aim is Your Success

Mycoplasma PCR Detection Kit

Cat. No.: PK3132 **Quantity:** 20 Reactions

Storage: -20°C **Shipment:** Wet Ice

توجه: لطفا قبل از استفاده از کیت، محلول‌های MIX PCR I و MIX PCR II را با توجه به میزان مورد نیاز خود تقسیم کرده و در هر بار استفاده از ویال‌های تقسیم بندی شده خود استفاده نمایید و آن‌ها را در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

کیت تشخیص آلودگی مایکوپلاسما سیناکلون یک روش PCR سریع با حساسیت بالا به منظور شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسما در محیط کشت سلولی ارائه داده است. تمام مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR در کیت وجود دارد. حساسیت این کیت با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی مایکوپلاسما و به شیوه Nested PCR به منظور افزایش دقت و اختصاصیت و کاهش امکان خطا در تشخیص آلودگی محیط کشت انجام شده است. در نتیجه DNA سایر منابع نظیر بافت و نمونه و سلول یا آلودگی هایی نظیر E.coli قابل تکثیر در فرایند PCR نمی‌باشد. این کیت توانایی شناسایی گونه‌های مایکوپلاسما را دارا می‌باشد که شامل هشت گونه اصلی آلوده کننده محیط کشت سلولی است که تقریبا بالای 95% آلودگی را ناشی می‌شود. این گونه‌ها شامل : M.arginini, M.fermentans, M.hominis, M.hyorhinis, M.orale, M.pirum, M.salivarium, وA.laidlawii. نمونه‌های مثبت به راحتی از روی باند ژل آگارز آنها قابل شناسایی هستند که از 219 bp تا 426 bp بعنوان محصول PCR مرحله دوم قابل شناسایی است.

محتویات کیت

مواد و بافرها	حجم	ترکیبات موجود	شرایط نگهداری
بافر لیز	2 میلی لیتر	ترکیبات لیزکننده+ آنزیم هضم کننده	20- درجه سانتیگراد
PCR Mix I	290 میکرولیتر	بافر تکثیر شامل مقدار بهینه شده از بافرها, dNTP , آنزیم taq پلیمراز و مقدار بهینه شده از میکس پرایمرها	20- درجه سانتیگراد
PCR Mix II	290 میکرولیتر	بافر تکثیر شامل مقدار بهینه شده از بافرها, dNTP , آنزیم taq پلیمراز و مقدار بهینه شده از میکس پرایمرها	20- درجه سانتیگراد
آب دیونیزه	3 میلی لیتر	_	20- درجه سانتیگراد
کنترل مثبت	10 میکرولیتر	_	20- درجه سانتیگراد

تجهیزات و موادی که مورد نیاز است ولی در کیت وجود ندارد:

- میکروفیوژ
- هیتر بلاک در دمای 60 و 95 درجه سانتیگراد
- تجهیزات ژل آگارز
- دستگاه ترموسایکلر

روش تهیه نمونه

مراحل	
1	جمع آوری سلول: • سلول های سوسپانسیون: شمارش سلولها 10^4 تا 10^5 برای انجام مراحل نیاز است. • سلول های چسبنده: سلول ها را توسط اسکارپر از سطح فلاسک جدا کنید و در محیط کشت بصورت سوسپانسیون درآوردید. پیشنهاد میشود سلول ها با تریپسین یا EDTA جدانشوند چون این مواد باعث از بین رفتن مایکوپلاسما میشود.
2	سلول های سوسپانسیون (10^4 تا 10^5 سلول) را درون یک میکروتیوب تمیز بریزید و در دمای 4 درجه سانتیگراد در دور 13000 rpm به مدت 5 دقیقه رسوب دهید.
3	به آرامی و با دقت سوپرناتانت را دور بریزید. سلول ها را دوبار با بافر PBS(1x) شستشو داده و مجددا رسوب دهید.
4	رسوب سلولی را به آرامی درون 100 میکرولیتر بافر لیز حل کنید و به خوبی ورتکس کنید.
5	میکروتیوب حاوی بافر لیز و سلولها را به مدت یک ساعت در دمای 60 درجه سانتیگراد انکوبه کنید و در این مدت چند بار ویال را وارونه کنید و مجددا درون دمای 60 قرار دهید.
6	سپس نمونه را 10 دقیقه در دمای 95 درجه انکوبه کنید.
7	ضایعات سلولی را در دور 13000 rpm به مدت 5 دقیقه رسوب دهید و سپس سوپرناتانت آن را به آرامی به میکروتیوب تمیز منتقل کنید. نمونه در این مرحله برای PCR آماده است.

روش انجام PCR

اماده سازی نمونه, انجام مراحل PCR و تشخیص آن بهتر است در مکان های مستقل انجام شود. اگر امکان پذیر باشد بهتر است مراحل انجام PCR در زیر هود لامینار انجام شود. این بسیار مهم است که نمونه کنترل مثبت سایر نمونه ها را آلوده نکند. تا جایی که امکان دارد مواد را بصورت دربسته در زیر هود نگهداری کنید و فقط در هنگام نیاز در آن را باز کنید.

مرحله اول واکنش PCR

مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش مرحله اول براساس جدول زیر با هم ترکیب میشود.

ترکیبات	تست نمونه	کنترل منفی	کنترل مثبت

PCR Mix I	14/5 میکرولیتر	14/5 میکرولیتر	14/5 میکرولیتر
کنترل مثبت	_	_	1 میکرولیتر
نمونه	5 میکرولیتر	_	_
آب	5/5 میکرولیتر	10/5 میکرولیتر	9/5 میکرولیتر
حجم نهایی	25 میکرولیتر	25 میکرولیتر	25 میکرولیتر

پس از اضافه کردن مواد به آرامی آن را پیپتاژ کنید سپس درب تیوب را ببندید و به آرامی اسپین کنید تا محلول در ته تیوب به خوبی جمع گردد.

سپس تیوب ها را درون ترموسایکلر گذاشته براساس روش زیر مرحله اول PCR را انجام دهید.

پس از اتمام مرحله اول PCR نیازی به گذاشتن ژل الکتروفورز افقی نمونه نیست و محصول مستقیم به مرحله دوم واکنش منتقل میشود.

برنامه PCR در مرحله اول و دوم تست به شرح زیر است :

	Initial denaturation: 94°C for 2min		
	Temperature (°C)	Time(seconds)	Cycles
Denaturation	94	40	25
Annealing	55	40	
Elongation	72	40	
	Final elongation :72°C for 1min 4°C on hold		

مرحله دوم واکنش PCR

پس از اتمام PCR مرحله اول محصول مرحله اول بعنوان الگو در مرحله دوم بکار میرود. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش مرحله دوم براساس جدول زیر با هم ترکیب میشود.

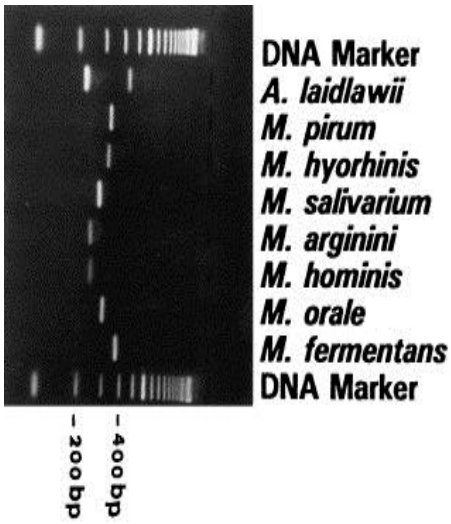
ترکیبات	تست نمونه و کنترل مثبت	کنترل منفی

PCR Mix II	14/5 میکرولیتر	14/5 میکرولیتر
نمونه (از واکنش اول)	5 میکرولیتر	....
آب	5/5 میکرولیتر	10/5 میکرولیتر
حجم نهایی	25 میکرولیتر	25 میکرولیتر

پس از پایان مرحله دوم 10 ماکرولیتر از محصول PCR را بر بروی ژل 2% بارگذاری کنید و درکنار انها نیز لدر bp 100 قرار دهید.

نتیجه

نمونه تستی که مایکوپلاسما مثبت باشد باید باندی در محدوده bp 290 مشاهده شود و در صورت صحیح بودن مراحل PCR نباید باند قابل رویتی در نمونه کنترل منفی دیده شود



species	second stage PCR size
M.arginini	236
M.fermentans	365
M.hominis	236
M.hyohinus	315
M.Orale	290
M.pirum	323
M.salivarum	269
A.laidlawii	426,219

مشکلات احتمالی

مشکل	دلیل احتمالی	راه حل
کنترل منفی باند دارد.	آلودگی در حین میکس مواد PCR اتفاق افتاده است	دوباره با مواد جدید PCR را انجام دهید و در صورت امکان برای انجام مراحل میکس ترکیبات PCR از هود لامینار استفاده شود.
باندی در خارج از محدوده آلودگی مایکوپلاسما مشاهده میشود.	باند غیر اختصاصی که معمولا به دلیل افزایش سیکل های PCR اتفاق می افتد.	این باندها الودگی مایکوپلاسما را نشان نمیدهند و نیازی به انجام کار خاصی نمیباشد.
کنترل مثبت باند ندارد.	فرآیند PCR به خوبی انجام نشده است	برنامه PCR مجددا مطابق با بروشور بررسی شود

مشاهده ی باند مرحله ی اول در Nested PCR محتمل است.	الگوی مرحله ی اول به دلیل غلظت بالا، روی ژل قابل مشاهده است.	کنترل مثبت دو باند در محدوده ی 300 و 500 دارد.

SinaClon BioScience
www.sinaclon.com
Tel: +98(0)21 4463 0050-51
+98(0)21 4466 5156
+98(0)2144666204
Mob.:**+989023120052** ,54,56
Customer Service: +98(0)9023120059
+98(0)26336670907
Place your order: order@sinaclon.com