SinaClon BioScience شرکت سیناکلون

Mycoplasma PCR Detection Kit

REF PK3132

20 TESTS

Wet Ice

RUO

-20

محتویات کیت

محتویات	حجم	ترکیبات موجود
بافر لیز	2ml	ترکیبات لیزکننده+ آنزیم هضم کننده
PCR Mix I	290µl	بافر تکثیر شامل مقدار بهینه شده از بافرها، dNTP، آنزیم Taq DNA Polymerase و میکس پرایمرها
PCR Mix II	290µl	بافر تکثیر شامل مقدار بهینه شده از بافرها، dNTP، آنزیم Taq DNA Polymerase و میکس پرایمرها
آب دیونیزه	3ml	–
کنترل مثبت	10ml	–

معرفی و کاربرد

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 موجود است. به منظور افزایش دقت و کاهش امکان خطا در تشخیص آلودگی محیط کشت، طراحی پرایمرهای مایکوپلاسما به شیوه Nested PCR انجام شده است، که این امر منجر به افزایش حساسیت و اختصاصیت کیت می‌شود. در نتیجه DNA سایر منابع نظیر بافت، سلول یا آلودگی‌هایی نظیر E.coli قابل تکثیر در فرایند PCR نمی‌باشد. این کیت توانایی شناسایی هشت گونه اصلی مایکوپلاسما، که تقریبا بالای ۹۵٪ منشا آلودگی محیط کشت سلولی هستند، را دارا می‌باشد. این گونه‌ها شامل: M.arginini، M.fermentans، M.hominis، M.hyorhinis، M.orale، M.pirum، M.salivarium و A.laidlawii. نمونه‌های مثبت به راحتی از روی باند ژل آگارز آن‌ها قابل شناسایی هستند که از 219bp تا 426bp به‌عنوان محصول PCR مرحله دوم قابل شناسایی است.

تجهیزات مورد نیاز

ردیف	تجهیزات و مواد
۱	میکروفیوژ
۲	هیتر بلاک در دمای ۶۰ و ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد
۳	تجهیزات ژل آگارز
۴	دستگاه ترموسایکلر

توجه: لطفا قبل از اســـتفاده از کیت، محلول‌های PCR Mix I و PCR MIX II را با توجه به میزان مورد نیاز خود تقســیم کرده و در هر بار اســتفاده از ویال‌های تقســیم‌بندی‌شــده خود استفاده نمایید و آن‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

روش کار

تهیه نمونه

۱. جمع‌آوری سلول:

- سـلول‌های سـوسـپانسـیون: تعداد سلول مورد نیاز جهت انجام مراحل کیت $۱۰^۴$ تا $۱۰^۵$ سلول می‌باشد.
- سـلول‌های چسـبنده: سـلول‌ها را توسط اسکارپر از سطح فلاسک جدا کنید و در محیط کشـت به‌صورت سوسپانسیون درآوردید. پیشنهاد می‌شود سلول‌ها با تریپسین یا EDTA جدا نشوند چون این مواد باعث از بین رفتن مایکوپلاسما می‌شوند.

۲. سـلول‌های سوسپانسیون ($۱۰^۴$ تا $۱۰^۵$ سلول) را درون یک میکروتیوب تمیز بریزید و در دمای 4°C در دور 13000rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب دهید.

۳. بـه آرامی و با دقت ســـوپرناتانت را دور بریزید. ســـلول‌ها را ۲ مرتبه با بافر PBS (1x) شستشو داده و مجددا رسوب دهید.

۴. بر روی رســوب ســلولی، 100µl بافر لیز بریزید و رســوب را به‌خوبی در آن حل کنید و ورتکس کنید.

۵. میکروتیوب حاوی بافر لیز و ســلول‌ها را به مدت یک ساعت در دمای 60°C انکوبه کنید و در این مدت چند بار ویال را وارونه کنید و مجددا درون دمای 60°C قرار دهید.

۶. سپس نمونه را ۱۰ دقیقه در دمای 95°C انکوبه کنید.

۷. ضـــایعات ســـلولی را در دور 13000 rpm به مدت ۵ دقیقه رســـوب دهید و ســـپس سوپرناتانت آن را به آرامی به میکروتیوب تمیز منتقل کنید.

*در این مرحله نمونه برای PCR آماده است.

انجام PCR

قبل از انجام واکنش PCR به نکات زیر دقت کنید:

- آماده‌سازی نمونه, آماده‌سازی مواد PCR و تشخیص آن در مکان‌های مستقل انجام گیرد.
- از هود لامینار جهت آماده‌سازی مواد PCR استفاده شود.
- از آلودگی نمونه‌ها به کنترل مثبت کیت جدا خودداری کنید.

مرحله اول واکنش PCR

۱. مواد مورد نیاز واکنش مرحله اول را براساس جدول زیر با هم ترکیب کنید.

ترکیبات	نمونه	کنترل منفی	کنترل مثبت
PCR Mix I	14.5µl	14.5µl	14.5µl
کنترل مثبت	-	-	1µl
نمونه	5µl	-	-
آب	5.5µl	10.5µl	9. µl
حجم نهایی	25µl	25µl	25µl

۲. مواد موجود در هر میکروتیوب را به آرامی پیپتاژ کنید. درب میکروتیوب را ببندید و اســـپین کنید تا محلول در ته میکروتیوب به خوبی جمع گردد.

۳. سپس میکروتیوب‌ها را درون ترموسایکلر گذاشته و پروتکل دمایی زیر را اجرا کنید.

۴. 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		

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

مرحله دوم واکنش PCR

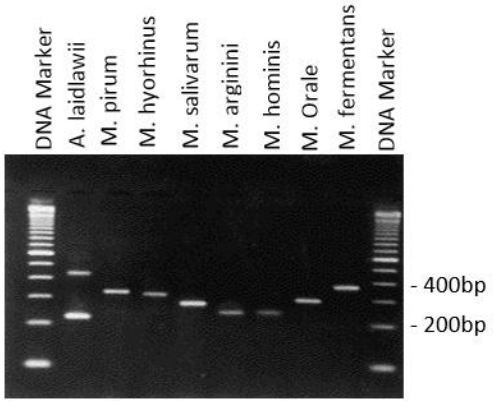
۱. محصـــول مرحله اول PCR را به‌عنوان الگو در مرحله دوم بکار ببرید و مواد مورد نیاز واکنش مرحله دوم را براساس جدول زیر با هم ترکیب کنید.

ترکیبات	نمونه و کنترل مثبت	کنترل منفی
PCR Mix II	14.5µl	14.5µl
نمونه (از واکنش اول)	5µl	-
آب	5.5µl	10.5µl
حجم نهایی	25µl	25µl

۲. پس از پـایان مرحله دوم 10µl از محصـــول PCR را بروی ژل 2% بارگذاری کنید و جهت بررسی سایز باندهای مشاهده‌شده ترجیحا از لدر 100 bp استفاده کنید.

آنالیز/نتیجه گیری

باند مشـاهده‌شده در تست حاوی کنترل مثبت باید در محدوده 290bp باشد و در صورت صحیح بودن مراحل PCR باندی در نمونه کنترل منفی مشاهده نخواهد شد.



Species	Second stage PCR size
M. arginini	236
M. fermentans	365
M. hominis	236
M. hyorhinus	315
M. Orale	290
M. pirum	323
M. salivarum	269
A. laidlawii	426,219

مشکلات احتمالی

مشکل	دلیل احتمالی	راه حل
مشاهده باند در کنترل منفی	آلودگی میکس مواد PCR	- تکرار تست با مواد جدید - جداسازی مکان آماده‌سازی میکس PCR و افزودن کنترل مثبت
مشاهده باند در خارج از محدوده آلودگی مایکوپلاسما	بالابودن تعداد سیکل‌های PCR	این باندها آلودگی مایکوپلاسما را نشان نمی‌دهند و نیازی به تکرار تست نیست.
عدم مشاهده باند کنترل مثبت	انجام نشدن صحیح فرآیند PCR	تکرار تست دقیقا ب مطابق با برنامه PCR بروشور
مشاهده دو باند در محدوده‌ی ۳۰۰ و ۵۰۰ در کنترل مثبت	بالابودن غلطت در الگوی مرحله‌ی اول	مشاهده ی باند مرحله ی اول در Nested PCR محتمل است و نیازی به تکرار تست نیست.

علائم و راهنماها

Signs	Definitions	Signs	Definitions
	Temperature range on product use		Name and address of the manufacturer of the product
RUO	For Research Use Only	REF	Product technical code
Σ	Number of usable tests		

SinaClon BioScience شرکت سیناکلون

Unit 9, Rouyesh building, Science and Technology Park, Tarbiat Modares University, Pajouhesh Blvd., Tehran, Iran

+982191082111
hi@sinaclon.com
www.sinaclon.com