



MycoReport

Набор реактивов для выявления контаминации микоплазмой культур клеток

Номер по каталогу: MR001

Инструкция по применению

Краткая информация

Назначение:

Набор позволяет выявить геномную ДНК шести наиболее распространенных видов микоплазмы, инфицирующих лабораторные культуры клеток.

Биологический материал:

- Культуральная жидкость клеток.
- ДНК, выделенная из культуры клеток.

Метод:

ПЦР с детекцией результатов по конечной точке, амплификация видоспецифичных участков генов 16S рРНК.

В состав набора входит UDG (Урацил-ДНК-Гликозилаза) для защиты от контаминации ПЦР-продуктом.

Отдельная реакция внутреннего контроля позволяет оценить наличие ингибиторов ПЦР, чтобы исключить ложноотрицательный результат.

Анализ результата:

Качественный анализ по наличию/отсутствию целевого ПЦР-продукта на агарозном гель-электрофорезе.

Основные характеристики

Аналитическая чувствительность: от 25 копий ДНК микоплазмы.

Размер ампликона: 516–519 п.о. (в зависимости от вида).

Количество образцов: от 16 до 46 образцов в зависимости от формата постановки.

Хранение и транспортировка: при –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Содержание

1. Состав набора и условия хранения	4
2. Описание набора	5
2.1. Назначение набора	5
2.2. Количество определений	5
2.3. Ограничения к применению	5
2.4. Аналитические характеристики набора	5
2.5. Принцип метода	5
2.6. Uracil-DNA glycosylase	6
3. Необходимое оборудование и дополнительные материалы	6
4. Меры предосторожности	7
5. Протокол проведения анализа	7
5.1. Подготовка образцов культуральной жидкости	8
5.2. Проведение реакции амплификации	8
5.3. Проведение электрофореза и анализ результатов	10
6. Возможные проблемы	13
7. Решение проблем	14
7.1. Ингибирование ПЦР	14
7.2. Контаминация реакции амплификации целевым ПЦР-продуктом	14
7.3. Потеря качества одного из реактивов набора	14

1. Состав набора и условия хранения

Компонент	Количество
5X PCRmix MycoReport	550 мкл
5X Oligo MycoPrim	275 мкл
5X Oligo MycoControl	275 мкл
Uracil-DNA glycosylase	100 мкл
MycoReport Control DNA	50 мкл
PBS	1.5 мл
Deionized water, nuclease-free	1.5 мл

- **5X PCRmix MycoReport** содержит все необходимые компоненты для ПЦР (реакционный буфер с ионами Mg^{2+} , нуклеотидтрифосфаты с урацилом (dUTP), Taq-полимеразу с «горячим стартом»), а также буфер для нанесения образцов на гель-электрофорез.
- **5X Oligo MycoPrim** содержит смесь специфичных праймеров для амплификации участка ДНК, кодирующего рибосомальную 16S РНК бактерий рода *Mycoplasma*.
- **5X Oligo MycoControl** содержит ДНК-матрицу внутреннего контроля и смесь специфичных к ней праймеров.
- **Uracil-DNA glycosylase (UDG)** катализирует гидролиз N-гликозильной связи между урацилом и сахарным остатком. Фермент используется для предотвращения контаминации ПЦР-смеси полученным ранее продуктом амплификации.
- **MycoReport Control DNA** представляет собой положительный контрольный образец (ПКО), содержащий фрагмент ДНК, который кодирует рибосомальную 16S РНК *Mycoplasma arginini*.
- **PBS (Phosphate Buffered Saline)** используется для подготовки исследуемых образцов для проведения анализа.

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Не более 10 циклов замораживания-размораживания.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

2. Описание набора

2.1. Назначение набора

Набор реактивов «MycoReport» предназначен для выявления контаминации культур клеток и тканей микроорганизмами родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma*. В качестве материала для анализа может быть использована культуральная жидкость клеток и тканей или ДНК, выделенная из культур клеток или тканей.

2.2. Количество определений

Набор рассчитан на 50 реакций, что позволяет проанализировать от 16 до 46 исследуемых образцов:

- Максимум (46) достигается при одновременном анализе образцов в формате 96-луночного планшета.
- Минимум (16) — при анализе образцов по одному.

2.3. Ограничения к применению

Набор реактивов «MycoReport» предназначен только для научно-исследовательских целей, выполняемых профессионально подготовленными пользователями. Набор не предназначен для использования в медицине и ветеринарии.

2.4. Аналитические характеристики набора

Аналитическая чувствительность набора — от 25 копий ДНК микоплазмы в реакции.

Размер амплифицируемых фрагментов (ампликонов):

- Целевой фрагмент гена микоплазмы (в зависимости от вида микроорганизма) в реакции с «5X Oligo MycoPrim» — от 516 до 519 п.о.
- Фрагмент внутреннего контроля в реакции с «5X Oligo MycoControl» — 272 п.о.

2.5. Принцип метода

Набор позволяет обнаружить геномную ДНК шести видов микроорганизмов, которые составляют около 95% случаев микоплазменных инфекций культур клеток: *Mycoplasma orale*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinis* и *Acholeplasma laidlawii*, а также ряда других родственных видов – *M. salivarium*, *M. bovis*, *M. lipophilum*, *M. canadense*. Специфичность анализа обеспечивается оптимизированной структурой олигонуклеотидных праймеров в отношении генов, кодирующих рибосомальную 16S РНК перечисленных видов микроорганизмов.

Для каждого исследуемого образца реакция ставится в двух пробирках — ПЦР с «5X Oligo MycoPrim», при которой происходит амплификация **целевого фрагмента** ДНК микоплазмы, и реакция с «5X Oligo MycoControl», в которой амплифицируется фрагмент ДНК **внутреннего контроля**.

По реакции с «5X Oligo MycoControl» оценивается наличие ингибиторов ПЦР в образце, что позволяет исключить получение ложно-отрицательного результата.

2.6. Uracil-DNA glycosylase

Риск получения ложноположительных результатов ПЦР является одной из проблем лабораторий. Полученная в результате ПЦР ДНК может стать источником контаминации при последующих анализах, особенно если результат амплификации анализируется методом гель-электрофореза. Для предотвращения контаминации в реакционную смесь добавляют два дополнительных компонента:

- «Uracil-DNA glycosylase» (UDG) – входит в состав набора в виде отдельного компонента.
- dUTP (уридин-5'-трифосфат) – входит в состав «5X PCRmix MycoReport».

В ходе ПЦР урацил встраивается в ДНК вместо тимина, образуя модифицированную ДНК, при этом эффективность реакции практически не изменяется.

При попадании такого ПЦР-продукта в следующую реакцию, на первой стадии программы амплификации фермент UDG катализирует гидролиз N-гликозильной связи между урацилом и сахарным остатком как в одно-, так и в двухцепочечной ДНК. При этом образуется поврежденный нуклеотид, лишенный азотистого основания (апиримидинизация), который блокирует работу ДНК-полимераз. Матрица из природного источника, не имеющая в своем составе урацила, не повреждается и успешно амплифицируется.

3. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

Необходимое оборудование

- Настольная микроцентрифуга.
- Термостат.
- Амплификатор.
- Оборудование для проведения электрофореза в агарозном геле.

Дополнительные материалы

- Стерильные микроцентрифужные пробирки (1.5–2 мл).
- Стерильные пробирки для ПЦР.
- Регулируемые дозаторы.
- Наконечники для дозаторов с гидрофобным фильтром.
- Реактивы для приготовления агарозного геля и проведения электрофореза: агароза, бромистый этидий и ТАЕ-буфер (например, кат. # PB022 или # PB122, Евроген).
- Маркер длин ДНК (например, 100+ bp DNA Ladder, кат. # NL002 или 1 kb DNA Ladder, кат. # NL001, Евроген).

4. Меры предосторожности

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации, особенно при использовании агарозного гель-электрофореза для детекции продуктов ПЦР.

Благодаря использованию UDG риск контаминации продуктами ПЦР снижен, однако этот вид защиты не дает полной гарантии от контаминации. Поэтому для предотвращения контаминации этапы работы необходимо проводить в изолированных рабочих зонах, снабженных комплектами автоматических пипеток и всеми необходимыми расходными материалами и оборудованием:

- **Зона 1 для подготовки образцов** (для выделения ДНК и подготовки образцов для ПЦР).
- **Зона 2 для приготовления ПЦР-реакции:**
 - 2а — для подготовки реакционной смеси;
 - 2б — для внесения ДНК в реакционную смесь.Зоны 2а и 2б могут быть совмещены в одном помещении при наличии в нем отдельных рабочих мест с отдельными комплектами пипеток.
- **Зона 3 для проведения амплификации.**
- **Зона 4 для манипуляций с ПЦР-продуктом** (гель-электрофорез).

ПЦР-амплификаторы не должны располагаться в зонах 1, 2 и 4.

5. Протокол проведения анализа

Для выделения геномной ДНК допустимо использование любого метода (например, выделение на колонках при помощи набора «ExtractDNA Blood», кат. # BM011, # BM012 или # BM013, Евроген).

5.1. Подготовка образцов культуральной жидкости

- 1) Культивируйте клетки в течение 2–3 дней в рекомендованной ростовой среде. Анализируемые клетки должны достичь высокой плотности ко дню проведения анализа (культивируйте монослойные культуры до достижения 80-90 % монослоя, суспензионные клетки – до достижения концентрации около 1 млн/мл).
- 2) Отберите 1 мл культуральной среды (двух-трехдневной) в микроцентрифужные пробирки, осадите клетки и клеточный дебрис центрифугированием в течение 5 минут при 1 000 – 1 300 g.
- 3) Перенесите супернатант в новые пробирки и центрифугируйте на максимальной скорости (15 000 – 20 000 g) в течение 10 минут.
- 4) Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок (осадок может быть невидим, в этом случае можно оставить на дне 5–10 мкл жидкости).
- 5) Добавьте 50 мкл «PBS» к осадку и тщательно ресуспендируйте микропипеткой.
- 6) Прогрейте пробирки при +95 °С в течение 10 минут.

Подготовленные таким образом образцы могут храниться при –20 °С для дальнейшего использования (рекомендуется прогревать образцы при +95 °С в течение 10 минут перед каждым использованием).

5.2. Проведение реакции амплификации

В каждую постановку ПЦР необходимо включать два контрольных образца:

- «MycoReport Control DNA»,
- NTC (контроль без добавления матрицы). В качестве образца используется «PBS» (если им были разведены исследуемые образцы) или вода.

Все образцы, включая контрольные, должны быть проанализированы по двум реакциям — MR (с использованием компонента «5X Oligo MycoPrim») и MC (с использованием компонента «5X Oligo MycoControl»).

ВНИМАНИЕ! АМПЛИФИКАЦИЮ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ОБРАЗЦОВ НЕОБХОДИМО ПРОВОДИТЬ В ОДИН И ТОТ ЖЕ ДЕНЬ.

Иначе остаточной активности UDG может быть достаточно для частичного расщепления наработанного ПЦР-продукта, что приведет к ложноотрицательным результатам.

- 1) Рассчитайте необходимый объем общих компонентов ПЦР, исходя из количества образцов, которые планируется проанализировать, согласно Таблице 1.

Таблица 1. Расчет количества компонентов для реакции.

Компонент	Общая смесь MR, мкл *	Общая смесь MC, мкл *
5X PCRmix MycoReport	$5.5 \times (N+2)$	$5.5 \times (N+2)$
5X Oligo MycoPrim	$5.5 \times (N+2)$	—
5X Oligo MycoControl	—	$5.5 \times (N+2)$
UDG	$1 \times (N+2)$	$1 \times (N+2)$
Deionized water, nuclease-free	$13.2 \times (N+2)$	$13.2 \times (N+2)$
Объем общей смеси	$23 \times (N+2)$	$23 \times (N+2)$

Где N — количество исследуемых образцов в одной постановке ПЦР, контрольные образцы учтены в формуле.

* Количество компонентов указано с учетом небольшого запаса, рассчитанного на компенсацию возможной погрешности дозаторов.

- 2) Разморозьте компоненты набора (допускается кратковременное прогревание в термостате при температуре не выше +37 °С).
- 3) Тщательно перемешайте размороженные компоненты, не допуская образования пены, осадите капли в микроцентрифуге в течение 5 сек.
- 4) Приготовьте в двух пробирках на 1.5 мл две реакционные смеси, исходя из количества образцов согласно Таблице 1, обозначив одну пробирку **MR**, другую **MC**.
- 5) Тщательно перемешайте полученные смеси, сбросьте капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 сек.
- 6) Подготовьте пробирки или плашку для ПЦР, промаркируйте пробирки или сделайте разметку плашки, учитывая, что каждый образец будет проанализирован в двух реакционных смесях.

	MR (целевая)						MC (внутренний контроль)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	И01	И09	И17	И25	И33	И41	И01	И09	И17	И25	И33	И41
B	И02	И10	И18	И26	И34	И42	И02	И10	И18	И26	И34	И42
C	И03	И11	И19	И27	И35	И43	И03	И11	И19	И27	И35	И43
D	И04	И12	И20	И28	И36	И44	И04	И12	И20	И28	И36	И44
E	И05	И13	И21	И29	И37	И45	И05	И13	И21	И29	И37	И45
F	И06	И14	И22	И30	И38	И46	И06	И14	И22	И30	И38	И46
G	И07	И15	И23	И31	И39	К	И07	И15	И23	И31	И39	К
H	И08	И16	И24	И32	И40	NTC	И08	И16	И24	И32	И40	NTC

Рис. 1. Рекомендуемое расположение образцов на плашке при полной загрузке амплификатора (46 образцов).

И01, И02, ... , Иn – исследуемые образцы;

К (MR-К и MC-К) – положительный контрольный образец (добавлен MycoReport Control DNA);

NTC (MR-NTC и MC-NTC) – контроль NTC (добавлен PBS).

- 7) Разнесите каждую реакционную смесь по 23 мкл по пробиркам для ПЦР: **серия MR и серия MC.**
- 8) Добавьте по 2 мкл каждого исследуемого образца в соответствующую пару пробирок: **MR и MC**; закройте пробирки.
- 9) Добавьте по 2 мкл «MycoReport Control DNA» в соответствующую пару контрольных пробирок: **MR-K и MC-K**; закройте пробирки.
- 10) Добавьте по 2 мкл «PBS» в пару пробирок: **MR-NTC и MC-NTC**; закройте пробирки.
- 11) Перемешайте содержимое пробирок и сбросьте капли центрифугированием пробирок в течение 15 сек.
- 12) Аккуратно перенесите пробирки в блок амплификатора. Включите амплификатор для поведения ПЦР и запустите программу амплификации согласно Таблице 2.

Таблица 2. Программа амплификации.

Температура	Стадия	Время инкубации	Кол-во циклов
+37 °С	Обработка UDG	10 мин	1
+95 °С	Предварительная денатурация	10 мин	1
+95 °С	Денатурация	15 сек	
+62 °С	Отжиг	15 сек	35
+72 °С	Элонгация	15 сек	

5.3. Проведение электрофореза и анализ результатов

ВНИМАНИЕ! АМПЛИФИКАЦИЮ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ОБРАЗЦОВ НЕОБХОДИМО ПРОВОДИТЬ В ОДИН И ТОТ ЖЕ ДЕНЬ.

- 1) Подготовьте 1% агарозный гель на 1X TAE-буфере, содержащий бромистый этидий в концентрации до 0.3 мкг/мл.
- 2) Расставьте пробирки в порядке нанесения на гель.
- 3) Нанесите в лунки геля по 2–5 мкл из каждой пробирки. Образцы ПЦР-продукта не требуют добавления буфера для нанесения на гель. Для определения длин ПЦР-продуктов в крайние лунки геля нанесите маркеры длин ДНК (например, 100+ bp DNA Ladder, кат. #NL002 или 1 kb DNA Ladder, кат. #NL001, Евроген).

- 4) Проведите электрофорез в соответствии с инструкцией для вашего оборудования. Реакционная смесь «MycReport» содержит красный и желтый красители для визуализации хода электрофореза. В 1% агарозном геле с 1X TAE буфером электрофоретическая подвижность красного красителя соответствует фрагменту ДНК размером 1000 п.о., желтый краситель мигрирует с фронтом на уровне фрагментов 20–30 п.о.
- 5) Проанализируйте результаты гель-электрофореза в соответствии с Таблицей 3. Постановка эксперимента считается корректной, если в образце «MR-K» (положительный контроль) присутствует один фрагмент ДНК длиной ≈ 500 п.о. и в образце «MR-NTC» (контроль без матрицы) продукт ПЦР отсутствует. В образцах «MC-K» и «MC-NTC» при этом присутствуют фрагменты ДНК длиной 272 п.о. Анализ результатов возможен только при выполнении этих условий.

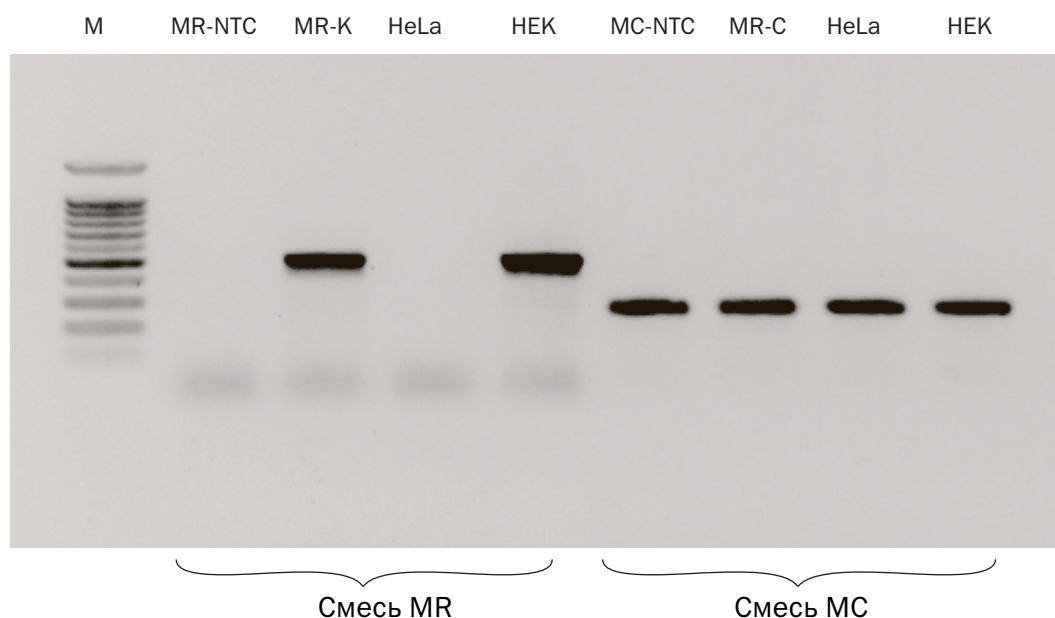


Рис. 2. Пример электрофореграммы в УФ ПЦР-продуктов в агарозном геле (TAE, 1% агарозы), при нанесении по 3 мкл реакционной смеси.

По результатам проверки в образце из линии клеток HEK 293 выявлена контаминация микоплазмой.

M – Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder;

NTC – контроль без матрицы (MR-NTC, MC-NTC);

ПКО – положительный контрольный образец (MR-K, MR-C);

HeLa – исследуемый образец линии клеток HeLa;

HEK – исследуемый образец линии клеток HEK 293.

Таблица 3. Анализ результатов ПЦР.

Образец	Результат в реакции MR	Результат в реакции MC	Заключение
NTC	Амплификации нет	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Контаминация ДНК не обнаружена
ПКО (К)	Фрагмент ДНК ≈500 п.о.	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Компоненты набора функционально активны
Исследуемый образец	Фрагмент ДНК ≈500 п.о.	Фрагмент ДНК 272 п.о.	ДНК микоплазмы выявлена
	Амплификации нет	фрагмент ДНК 272 п.о.	ДНК микоплазмы не выявлена
	Амплификации нет	Амплификации нет или продукта намного меньше, чем в контрольных образцах «МС-К» и «МС-NTC»	Ингибирование ПЦР

6. Возможные проблемы

При работе с набором наиболее часто возникающие ошибки — недостаточное прогревание образцов культуральной жидкости перед ПЦР или плохое перемешивание реагентов перед реакцией. Для диагностики проблем, связанных с контаминацией или качеством реактивов, воспользуйтесь Таблицей 4.

Таблица 4. Возможные проблемы.

Образец	Результат в реакции MR	Результат в реакции MS	Заключение
NTC	Фрагмент ДНК ≈500 п.о.	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Контаминация реакции амплификации целевым продуктом
ПКО (К)	Амплификации нет	Амплификации нет	Ошибка в постановке эксперимента или потеря качеств одного из реактивов набора (при несоблюдении условий хранения или транспортировки)
ПКО (К)	Амплификации нет	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Ошибка в постановке эксперимента или потеря качеств одного из реактивов набора (при несоблюдении условий хранения или транспортировки)
Исследуемый образец	Амплификации нет	Амплификации нет или продукта заметно меньше, чем в контрольных образцах	Ингибирование ПЦР или ошибка в постановке эксперимента. Требуется повторная постановка, желательно переочистить образец.
NTC/ ПКО (К)/ Исследуемый образец	Фрагмент ДНК ≈500 п.о.	Амплификации нет	Ошибка в постановке эксперимента. Повторная постановка не требуется.

7. Решение проблем

7.1. Ингибирование ПЦР

Концентрированные образцы культуральной жидкости, содержащей сыворотку, могут содержать ингибиторы ПЦР. В большинстве случаев помогает прогрев образцов при +95 °С в течение 10 мин. Если прогрев не устраняет проблему, рекомендуется провести выделение ДНК из клеток или культуральной жидкости. Для этого можно воспользоваться любым набором для выделения геномной ДНК, например набором «ExtractDNA Blood» (кат. # VM011, # VM012, Евроген).

7.2. Контаминация реакции амплификации целевым ПЦР-продуктом

Набор «MycoReport» включает систему защиты от контаминации ПЦР-продуктами.

Однако при недостаточно аккуратной работе можно контаминировать реакцию NTC геномной ДНК из исследуемого образца или из положительного контрольного образца, входящего в состав набора («MycoReport Control DNA»).


При контаминации рекомендуется промыть дозаторы и рабочие поверхности раствором, дезактивирующим ДНК; при необходимости заменить реактивы набора.


7.3. Потеря качества одного из реактивов набора

Проверьте срок годности набора и условия хранения. При нарушении условий хранения или транспортировки реактивы могут испортиться раньше указанного срока. При соблюдении правил хранения набора, обратитесь к производителю

support@evrogen.ru



Наборы и сервисы Евроген



 – ссылка на страницу НАБОРА


 – ссылка на страницу СЕРВИСА


Выделение и очистка нуклеиновых кислот 


Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ 


Синтез и амплификация кДНК  

Клонирование ДНК  

Выявление контаминации микоплазмой 


Оценка ДНК 

Нормализация кДНК  

Практикум по генной инженерии 

Генотипирование 

Синтез олигонуклеотидов и зондов 

Секвенирование по Сэнгеру 

NGS секвенирование 

Синтез генов 

Сайт-направленный мутагенез 

Синтез органических соединений 

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru