



# MycoReport

Набор реактивов  
для выявления контаминации микоплазмой в культурах 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 по конечной точке, амплификация видоспецифичных участков генов 16S рРНК.

В состав введена 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 в агарозном геле.

### Основные характеристики

Аналитическая чувствительность:

- От 25 копий ДНК микоплазмы при анализе культуральной жидкости;
- От 25 копий микоплазмы при анализе геномной ДНК, выделенной из культуры клеток.

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°C.

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения – 1 год со дня поставки.

## Содержание

1.	Состав набора и условия хранения . . . . .	4
2.	Описание набора . . . . .	5
2.1.	Назначение набора . . . . .	5
2.2.	Ограничения к применению . . . . .	5
2.3.	Аналитические характеристики набора . . . . .	5
2.4.	Принцип метода . . . . .	5
2.5.	Урацил-ДНК-гликозилаза . . . . .	6
3.	Дополнительные необходимые материалы и оборудование . . . . .	6
3.1.	Приборы . . . . .	6
3.2.	Расходные материалы . . . . .	7
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 MycoReport ПЦР-смесь	550 мкл
5X реагент MycoPrim	275 мкл
5X реагент MycoControl	275 мкл
Урацил-ДНК-гликозилаза	100 мкл
Контрольная ДНК (ПКО)	50 мкл
Ресуспенсирующий буфер PBS	1.5 мл
Вода для ПЦР	1.8 мл

- **5X MycoReport ПЦР-смесь** 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 реагент MycoPrim** содержит смесь специфичных праймеров для амплификации участка ДНК, кодирующего рибосомальную 16S РНК бактерий рода *Mycoplasma*.
- **5X реагент MycoControl** содержит ДНК-матрицу внутреннего контроля и смесь специфичных к ней праймеров.
- **Урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ)** катализирует гидролиз N-гликозильной связи между урацилом и сахарным остатком. Фермент используется для предотвращения контаминации ПЦР-смеси полученным ранее продуктом амплификации.
- **Контрольная ДНК (ПКО)** представляет собой положительный контрольный образец, содержащий фрагмент ДНК, кодирующий рибосомальную 16S РНК *Mycoplasma arginini*.
- **Ресуспенсирующий буфер PBS** используется для подготовки исследуемых образцов для проведения анализа.

**Хранение и транспортировка:** –20 °С.

Не более 10 циклов замораживания-размораживания.

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год с даты поставки.

## 2. Описание набора

### 2.1. Назначение набора

Набор реактивов «MycroReport» 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.

**Количество определений**, которое можно выполнить одним набором:

- 16 образцов при анализе экспериментальных образцов по одному;
- Максимум – 46 образцов при одновременном анализе экспериментальных образцов в формате 96-луночного планшета.

### 2.2. Ограничения к применению

Набор реактивов «MycroReport» предназначен только для научно-исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями. Набор не предназначен для диагностических целей.

### 2.3. 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 реагентом MycroPrim – от 516 до 519 п.о.;
- Фрагмент внутреннего контроля в реакции с реагентом MycroControl – 272 п.о.

### 2.4. 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. hyorhinae* 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 реагентом MycroPrim, при которой происходит амплификация **целевого фрагмента** ДНК микоплазмы, и реакция с реагентом MycroControl, в которой амплифицируется фрагмент ДНК **внутреннего контроля**.

По реакции с реагентом MucosControl оценивается наличие ингибиторов ПЦР в экспериментальном образце, что позволяет исключить получение ложно-отрицательного результата.

Рекомендуется в каждую постановку ПЦР (вне зависимости от количества анализируемых образцов) включать два контрольных образца:

- Положительный контроль (ПКО, входит в состав набора);
- Отрицательный контроль без матрицы (NTC, no template control).

## 2.5. Урацил-ДНК-гликозилаза

Риск ложноположительных результатов ПЦР является одной из проблем лабораторий, использующих метод ПЦР в исследовательских и диагностических целях. 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:

- Фермент урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ) – в отдельной пробирке;
- dUTP (уридин-5'-трифосфат) – входит в состав 5X MucosReport ПЦР-смеси наряду с dTTP.

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 УДГ 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. Дополнительные необходимые материалы и оборудование

### 3.1. Приборы

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

## 3.2. Расходные 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, ТАЕ-буфер, бромистый этидий);
- 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 УДГ 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.
- **Зона 3 для манипуляций с ПЦР-продуктом** (гель-электрофорез).

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

## 5. Протокол проведения анализа

Набор позволяет выявить ДНК микоплазмы в геномной ДНК, выделенной из культур клеток или тканей.

Также для анализа можно использовать образцы культуральной жидкости.

Для выделения геномной ДНК допустимо использование любого метода (например, при помощи набора «ExtractDNA Blood», кат.# VM011, # VM012, 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 «Ресуспенсирующего буфера» к осадку и тщательно ресуспенсируйте 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

Реакции с исследуемыми образцами необходимо ставить одновременно с двумя контрольными:

- Отрицательный контроль – реакция без матрицы (NTC) для контроля чистоты реактивов;
- Положительный контроль – реакция с образцом ПКО, содержащим фрагмент ДНК *M.arginini* (входит в состав набора).

Для всей серии образцов (включая контрольные) готовят **две реакционные смеси** без матрицы – **MR** (для амплификации ДНК микоплазмы) и **MC** (для контроля амплификации), которые затем разносятся по чистым пробиркам для ПЦР. На последнем этапе в пробирки добавляют анализируемые образцы, положительный контроль, отрицательный контроль.

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

Иначе остаточной активности УДГ 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 ПЦР-смесь MycoReport	$5.5 \times (N+2)$	$5.5 \times (N+2)$
5x реагент MycoPrim	$5.5 \times (N+2)$	–
5x реагент MycoControl	–	$5.5 \times (N+2)$
УДГ	$1 \times (N+2)$	$1 \times (N+2)$
Вода для ПЦР	$13.2 \times (N+2)$	$13.2 \times (N+2)$
Объем общей смеси	$23 \times (N+2)$	$23 \times (N+2)$

Где N – количество исследуемых образцов в одной постановке ПЦР.

\* 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 °C).
- 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 планшета, учитывая, что каждый образец будет проанализирован в двух реакционных смесях.
- 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 ПКО в соответствующую пару контрольных пробирок: **MR-K** и **MC-K**; закройте пробирки.
- 10) Добавьте по 2 мкл «Ресуспендирующего буфера» 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 проведения ПЦР и запустите программное обеспечение согласно Таблице 2.

**Таблица 2.** Программа амплификации.

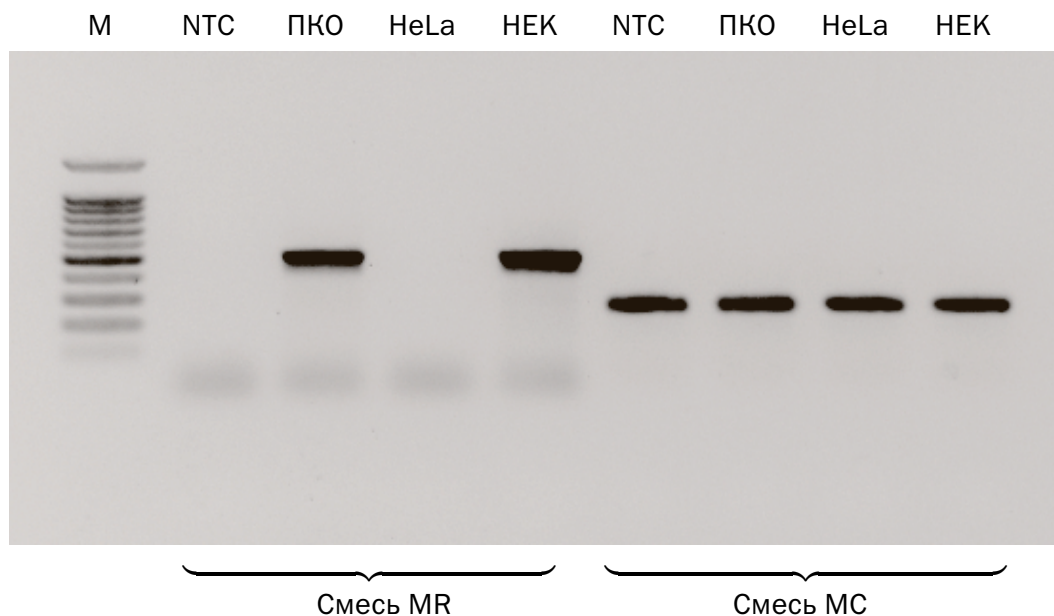
Температура	Стадия	Время инкубации	Кол-во циклов
+37 °С	Обработка УДГ	10 мин	1
+95 °С	Предварительная денатурация	5 мин	1
+95 °С	Денатурация	15 сек	
+62 °С	Отжиг	15 сек	35
+72 °С	Элонгация	15 сек	

### 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. Пробы 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 MisoReport 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 1 000 п.о., желтый краситель мигрирует с фронтом на уровне фрагментов 20–30 п.о.

5) Проанализируйте результаты гель-электрофореза в соответствии с Таблицей 3 (см. стр. 12). Постановка эксперимента считается корректной, если в образце «MR-K» (положительный контроль) присутствует один фрагмент ДНК длиной  $\approx 500$  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. См. Рисунок 1.



**Рис. 1.** Пример электрофореграммы в УФ ПЦР-продуктов в агарозном геле (ТАЕ, 1% агарозы), при нанесении по 3 мкл реакционной смеси. По результатам проверки в образце из линии клеток HEK 293 выявлена контаминация микоплазмой.

М – Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder;  
 NTC – контроль без матрицы;  
 ПКО – положительный контрольный образец;  
 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	Фрагмент ДНК $\approx$ 500 п.о.	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Компоненты набора функционально активны
Исследуемый образец	Фрагмент ДНК $\approx$ 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 MC	Заключение
NTC	Фрагмент ДНК ≈500 п.о.	Фрагмент ДНК 272 п.о.	Контаминация реакции амплификации целевым продуктом
ПКО	Амплификации нет	Амплификации нет	Ошибка в постановке эксперимента или потеря качеств одного из реактивов набора (при несоблюдении условий хранения или транспортировки)
ПКО	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/ 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 «MusoReport» 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.

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 [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)

# Продукты и услуги компании Евроген

## Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки

нуклеиновых кислот **P**▶▶▶

Маркеры длин ДНК **P**▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**▶▶▶

Приготовление библиотек кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Синтез кДНК и RACE **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Клонирование ДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Нормализация кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Практикум по генной инженерии **P**▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру **S**▶▶▶

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**▶▶▶

Синтез генов **S**▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)

**P**▶▶▶ – ссылка на страницу  
ПРОДУКТА

**S**▶▶▶ – ссылка на страницу  
УСЛУГИ

## Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**▶▶▶

Флуоресцентные белки **P**▶▶▶

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**▶▶▶

Антитела против флуоресцентных белков **P**▶▶▶

Временная трансфекция клеточных линий **S**▶▶▶

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**▶▶▶

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)

## Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии

и генетики наследственных заболеваний **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [oncology@evrogen.ru](mailto:oncology@evrogen.ru)

Евроген  
Москва 117997  
ул. Миклухо-Маклая 16/10  
корпус 15  
Тел.: +7 (495) 988-4083  
Факс: +7 (495) 988-4085  
[www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)