

## Myco Real-Time

Набор реактивов для выявления контаминации микоплазмой культур клеток методом ПЦР-РВ

Номер по каталогу

MR004

Инструкция по применению

## Оглавление

I.	Введение .....	2
II.	Назначение .....	2
III.	Метод .....	2
IV.	Совместимость с приборами ПЦР-РВ .....	3
V.	Основные характеристики .....	3
VI.	Количество определений .....	5
VII.	Состав .....	5
VIII.	Транспортировка и хранение .....	6
IX.	Срок годности .....	6
X.	Дополнительные необходимые материалы и оборудование .....	6
XI.	Меры предосторожности .....	7
XII.	Биологический материал .....	8
XIII.	Протокол .....	8
XIV.	Анализ результатов .....	11
XV.	Решение проблем .....	13

## I. Введение

Микроорганизмы класса *Mollicutes* (роды *Mycoplasma* и *Acholeplasma*) являются частыми контаминантами культур эукариотических клеток. Небольшие размеры и устойчивость ко многим антибиотикам затрудняют своевременное выявление и устранение контаминации.

Заражение микоплазмой существенно изменяет биохимию клеток, их антигенные свойства и параметры роста культуры. Экспериментальная работа с контаминированными образцами может приводить к получению невоспроизводимых или ложных результатов, а также к их ошибочной интерпретации. В связи с этим все поступающие в коллекцию линии клеток должны контролироваться на контаминацию микоплазмой.

При культивировании клеток рекомендуется проверять их не реже одного раза в месяц, поскольку источником заражения может быть культуральная среда, ее компоненты или сам исследователь.

## II. Назначение

Набор реактивов Myco Real-Time предназначен для обнаружения ДНК микроорганизмов класса *Mollicutes* методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалом для анализа является ДНК, выделенная из культур клеток, культуральной жидкости или реагентов для работы с клеточными культурами.

В качестве экспресс-теста допустимо анализировать культуральную жидкость или смывы с поверхностей без выделения ДНК.

Структура праймеров позволяет детектировать ДНК не менее 50 видов микроорганизмов класса *Mollicutes*, в т.ч. наиболее часто встречающихся в лабораторных условиях контаминантов клеточных культур (роды *Mycoplasma* и *Acholeplasma*).

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

Не для применения в медицине и ветеринарии.

## III. Метод

Определение ДНК микоплазм проводится методом ПЦР-РВ с зондами типа TaqMan.

Для определения присутствия ДНК микоплазмы проводят **специфическую амплификацию** фрагмента высококонсервативного участка генома, кодирующего 16S рРНК. Образование специфического продукта амплификации регистрируется в канале FAM. Эффективность специфической амплификации может снижаться в присутствии ингибиторов ПЦР в составе образца.

Для выявления ингибиторов ПЦР одновременно в этой же пробирке происходит амплификация **внутреннего контроля** (ВК) с искусственной ДНК-матрицы, включенной в состав реакционной смеси. Реакция ВК регистрируется в канале HEX.

#### IV. Совместимость с приборами ПЦР-РВ

Набор адаптирован для использования на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Допустимо использование амплификаторов: DTprime (ДНК-Технология), RotorGene Q (Qiagen), Applied Biosystems® 7500 (далее по тексту – ABI® 7500) и StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

#### V. Основные характеристики

Набор реактивов Myco Real-Time позволяет выявлять от нескольких копий генома микроорганизмов, наиболее часто контаминирующих культуры клеток в лабораторных условиях.

Набор выявляет наличие геномной ДНК бактерий родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* и не выявляет ДНК бактерий родов *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, насекомых и млекопитающих. Список организмов, использованных в испытаниях, приведен в таблице на стр. 4.

##### Предел обнаружения

Предел обнаружения различается для разных видов класса *Mollicutes*. Установлен предел обнаружения следующих видов:

Вид	Копии в реакции*
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	2
<i>Mycoplasma arginini</i>	2
<i>M. fermentans</i>	2
<i>M. gallisepticum</i>	4
<i>M. hyorhinis</i>	4
<i>M. orale</i>	4
<i>M. pneumonia</i>	4

\* Предел обнаружения ПЦР-методов обычно определяют в копиях генома; реже – в КОЕ (колониеобразующие единицы, англ. CFU).

Предел обнаружения определялся в копиях генома, поскольку это стабильная единица, в то время как КОЕ может содержать от 5 до 10 000 микоплазм (в зависимости от вида, стадии и условий культивации).

## Специфичность

Список организмов, ДНК которых были проверены набором в процессе валидационных испытаний:

### Микроорганизмы класса *Mollicutes*

Название организма	Источник ДНК	Результат
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Геномная ДНК, PCR Quantification Standards, Minerva Biolabs	выявлено
<i>Mycoplasma arginini</i>		выявлено
<i>M. fermentans</i>		выявлено
<i>M. gallisepticum</i>		выявлено
<i>M. genitalium</i>		выявлено
<i>M. hominis</i>		выявлено
<i>M. hyorhinis</i>		выявлено
<i>M. orale</i>		выявлено
<i>M. penetrans</i>		выявлено
<i>M. pneumonia</i>		выявлено
<i>M. salivarium</i>		выявлено

### Другие бактерии, млекопитающие и насекомые (20 000 копий генома в реакции)

Название организма	Источник ДНК	Результат
<i>Clostridium perfringens</i>	Штамм ATCC 13124 (B-6433)	не выявлено
<i>Escherichia coli</i>	Штамм BL21 (DE3)	не выявлено
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Штамм ATCC 4356 (B-8049)	не выявлено
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Штамм PAO1	не выявлено
<i>Streptococcus salivarius</i>	Штамм ATCC 14485 (B-8121)	не выявлено
<i>Canis l. Familiaris</i> (Домашняя собака)	Культура клеток MDCK	не выявлено
<i>Chlorocebus sp.</i> (Зеленая мартышка)	Культура клеток Vero	не выявлено
<i>Cricetulus griseus</i> (Китайский хомячок)	Культура клеток CHO	не выявлено
<i>Homo sapiens</i>	Культура клеток HEK293T	не выявлено
<i>Mus musculus</i> (Домовая мышь)	Культура клеток SP2/0	не выявлено
<i>Bombyx mori</i> (Тутовый шелкопряд)	Культура клеток BmN	не выявлено
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Кукурузная листовая совка)	Культура клеток SF21	не выявлено
<i>Trichoplusia ni</i> (Совка ни)	Культура клеток High five	не выявлено

## Устойчивость к интерферентам

Остатки среды для культивации клеток или вещества, используемые в наборах для выделения, могут ингибировать ПЦР. Одни из наиболее частых ингибиторов ПЦР для образцов, анализируемых данным набором: этанол, гуанидин и компоненты ростовой среды.

Параметр	Этанол	Гуанидин тиоционат	DMEM с 10% FBS
Концентрация ингибитора, привнесенная образцами, которая может ожидаться в ПЦР	<1 %	до 10 мМ	до 2 мкл на реакцию
Устойчивость набора при возможной концентрации ингибитора в образце	ДА	ДА	ДА
Максимальная концентрация ингибитора, к которой набор сохраняет устойчивость	3 %	30 мМ	6 мкл на реакцию

## VI. Количество определений

Набор рассчитан на 50 реакций, что позволяет проанализировать от 8 до 23 исследуемых образцов в двух технических повторностях. Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки амплификатора. Максимальное количество достигается при анализе всех образцов одновременно.

В каждую постановку необходимо включать два контрольных образца: положительный (ПКО, «MycοDNA Control») и контроль без матрицы (NTC, «Deionized water, nuclease-free»). Все реакции выполняются в двух технических повторностях.

Время выполнения ПЦР – 1.5 часа, с учетом подготовки проб – около 2.5 часов.

## VII. Состав

Компонент	Объем	Фасовка
5X PCRmix Myco RT	280 мкл	1 пробирка
5X Oligo Myco RT	280 мкл	1 пробирка
MycοDNA Control	70 мкл	1 пробирка
Deionized water, nuclease-free	1.5 мл	1 пробирка
PBS	1.5 мл	1 пробирка

«5X PCRmix Myco RT» – реакционная смесь для амплификации, содержит Taq-полимеразу с «горячим стартом», реакционный буфер с ионами Mg<sup>2+</sup>, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов.

«5X Oligo Myco RT» – смесь праймеров и детектирующих зондов с красителями FAM и HEX, в состав смеси включена искусственная матрица ДНК для амплификации внутреннего контроля.

«MycoDNA Control» – положительный контрольный образец, содержит матрицу ДНК, кодирующую фрагмент гена рибосомальной 16S РНК *Mycoplasma arginini*.

«Deionized water, nuclease-free» – деионизированная вода для ПЦР.

«PBS» (Phosphate Buffered Saline) – буферный раствор для ресуспендирования клеток или осадка культуральной жидкости.

## VIII. Транспортировка и хранение

Транспортировать и хранить при температуре –20 °С.

Допускается не более 10 циклов замораживания и размораживания.

## IX. Срок годности

При соблюдении условий хранения и транспортировки – 12 месяцев со дня поставки.

## X. Дополнительные необходимые материалы и оборудование

### Приборы и оборудование

- Ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- Автоматические дозаторы с переменным объемом на 10, 200 и 1000 мкл;
- Миницентрифуга-вортекс;
- Центрифуга с ротором для стрипов/планшетов;
- Амплификатор для проведения ПЦР-РВ с каналами FAM и HEX (Green и Yellow для прибора Rotor-Gene Q, FAM и VIC для ABI® 7500 и StepOnePlus™).

### Необходимые расходные материалы и реактивы

**ВНИМАНИЕ!** НАБОР РЕАКТИВОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НЕ ВХОДИТ В СОСТАВ НАБОРА Myco Real-Time.

- ExtractDNA Blood (кат. ## VM011, VM012 или VM013, Евроген) или аналогичный набор реактивов;
- Одноразовые наконечники с гидрофобным фильтром;
- Микроцентрифужные пробирки;
- Стрипы или планшет для амплификации;
- Перчатки для рук неопудренные.

## XI. Меры предосторожности

Все компоненты набора не токсичны для человека в используемых концентрациях.

Некоторые виды микоплазм рассматриваются как представители нормальной микрофлоры, обитающей на слизистых оболочках или кожных покровах человека. Поскольку набор реактивов обладает высокой чувствительностью к ДНК микоплазм, причиной ложноположительного результата анализа может оказаться попадание в реакционную смесь ДНК микоплазмы как от самого исследователя, так и из продукта амплификации, полученного ранее набором для выявления контаминации микоплазмой.

При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности: использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, все компоненты набора открывать только в стерильном ПЦР-боксе. После окончания амплификации пробирки не открывать и немедленно утилизировать.

Все этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях или в изолированных зонах, снабженных комплектами пипеток, халатами, 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 размещения амплификаторов.

**При работе всегда выполняйте следующие требования:**

- для каждой процедуры используйте новый наконечник с фильтром;
- приготовление реакционной смеси и выделение ДНК проводите в ПЦР-боксах;
- не перемещайте автоматические дозаторы, штативы, лабораторную посуду, халаты и растворы реактивов из одной зоны в другую;
- поверхности рабочих столов обрабатывайте бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение не менее 30 мин.



## XII. Биологический материал

Для исследования рекомендуется использовать предварительно выделенную ДНК. Выделение ДНК из клеточных культур можно выполнить набором ExtractDNA Blood (Евроген) или любым другим методом выделения и очистки геномной ДНК.

Микоплазмы могут обитать внутри и на поверхности клеток эукариот и в культуральной жидкости. Для выделения ДНК можно использовать свежий или замороженный материал клеток, ткани, культуральную жидкость.

При использовании для анализа образцов из культуральной жидкости без предварительной очистки, чувствительность метода может быть снижена из-за присутствия в образце ингибиторов ПЦР.

## XIII. Протокол

Перед проведением анализа необходимо подготовить исследуемый образец.

### 1. Подготовка образцов из культуральной жидкости

1.1. 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).

1.2. 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.

1.3. Перенесите супернатант в новые пробирки и центрифугируйте при максимальном ускорении (от 11 000 g) в течение 10 минут.

1.4. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок (осадок может быть невидим, в этом случае можно оставить на дне 5-10 мкл жидкости).

1.5. Добавьте 50 мкл раствора «PBS» к осадку и тщательно ресуспендируйте осадок пипеткой.

1.6. Прогрейте пробирки при +95 °C в течение 10 минут.

Подготовленные для анализа образцы культуральной жидкости могут храниться при -20 °C для дальнейшего использования. Перед каждым использованием рекомендуется прогревать образцы при +95 °C в течение 10 минут.

## 2. Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК допустимо использование любого метода (например, при помощи набора ExtractDNA Blood, кат. ## ВМ011, ВМ012 или ВМ013, Евроген).

## 3. Проведение реакции амплификации

Каждое исследование должно включать постановку двух контрольных образцов:

- **NTC (No Template Control)** – реакция без матрицы для контроля чистоты реактивов (в качестве образца используйте «Deionized water, nuclease-free»)
- **Положительный контроль** – реакция с положительным контрольным образцом (ПКО), содержащим фрагмент ДНК *M. arginini* («MycoDNA Control»).

**ВНИМАНИЕ!** ВСЕ ОБРАЗЦЫ, ВКЛЮЧАЯ КОНТРОЛЬНЫЕ, ДОЛЖНЫ БЫТЬ ПРОАНАЛИЗИРОВАНЫ В ДВУХ ТЕХНИЧЕСКИХ ПОВТОРНОСТЯХ.

Для всей серии образцов (включая контрольные) готовится общая реакционная смесь без матрицы, которая разносится по пробиркам, после чего в пробирки добавляют образцы ДНК. Контрольные образцы ПКО и NTC добавляются в последнюю очередь.

3.1. Разморозьте компоненты набора при комнатной температуре.

3.2. Тщательно перемешайте на вортексе размороженные компоненты, не допуская образования пены; осадите капли в микроцентрифуге в течение 5 с.

3.3. Для всей серии образцов (включая контрольные) рассчитайте необходимый объем компонентов ПЦР и приготовьте общую реакционную смесь в пробирке на 1.5 мл:

Компонент	На N образцов, мкл*
<b>ОБЩАЯ РЕАКЦИОННАЯ СМЕСЬ</b>	
5X PCRmix Myco RT	5.5 x (2N + 4)
5X Oligo Myco RT	5.5 x (2N + 4)
Deionized water, nuclease-free	14.3 x (2N + 4)
<b>ДОБАВЛЯЕТСЯ ОТДЕЛЬНО В КАЖДУЮ ПРОБИРКУ</b>	
Исследуемый образец / MycoDNA Control (ПКО) / Deionized water, nuclease-free (NTC)	2

N – количество исследуемых образцов.

\* Указано с учетом запаса для компенсации возможной погрешности дозаторов.

3.4. Тщательно перемешайте на вортексе полученную смесь, сбросьте капли со стенок пробирки в микроцентрифуге в течение 5 с.

3.5. Подготовьте пробирки или планшеты для ПЦР, промаркируйте пробирки или сделайте разметку планшета, учитывая, что каждый образец анализируется в двух технических повторностях.

*Не используйте маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Наносите маркировку на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.*

3.6. Разнесите реакцию смесь по 23 мкл в каждую пробирку.

3.7. Добавьте по 2 мкл ДНК-матрицы исследуемых образцов и ПКО («MycDNA Control»). Закрывайте пробирки сразу после добавления.

3.8. Добавьте по 2 мкл воды в пробирки, предназначенные для отрицательного контроля ПЦР (реакция NTC).

3.9. Сбросьте капли центрифугированием пробирок в течение 15 с.

3.10. Установите пробирки в блок амплификатора. В управляющей программе амплификатора выберите параметры:

- снятие кривой плавления не требуется;
- считывание флуоресценции в каналах FAM и HEX (Green и Yellow для прибора Rotor-Gene Q, FAM и VIC для ABI® 7500 и StepOnePlus™);
- пассивный референсный краситель не считывается;
- объем реакционной смеси – 25 мкл;
- программа амплификации:

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация (Hold)	95	3 мин	–
45 циклов (Cycling)	95	10 с	–
	60	1 мин	FAM, HEX

- для контрольных образцов установите тип образца:
  - «Positive Control» для образцов с ПКО;
  - «NTC» для образцов без добавления матриц;
- для исследуемых образцов установите тип образца «Unkown».

3.11. Запустите реакцию амплификации.

## XIV. Анализ результатов

**ВНИМАНИЕ!** СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ НА ДНК *Mollicutes* РЕГИСТРИРУЕТСЯ В КАНАЛЕ FAM, АМПЛИФИКАЦИИ ВК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ПЦР – В КАНАЛЕ HEX.

Режим анализа (Analysis Mode) – «Флуорофор» (Fluorophore).

1. Установите базовую линию (Baseline):

- для канала FAM – с 8 цикла по цикл, автоматически определяемый ПО прибора;
- для канала HEX – с 4 цикла по 12 цикл.

2. Установите пороговый уровень (Threshold):

- для канала FAM – на уровне 5% от уровня разгорания реакции ПКО;
- для канала HEX на том же уровне, что в канале FAM\*.

\* Для прибора StepOnePlus необходимо отдельное выставление порогового уровня для каждого канала – на уровне 7-10% от максимальной разгораемости в данном канале.

Показателем накопления продукта реакции является пороговый цикл ( $C_t$ , Threshold Cycle). ПО прибора автоматически определит  $C_t$  для каждого образца.

3. Оцените результат амплификации в контрольных образцах (контроль качества постановки ПЦР):

Образец	Ожидаемый результат в канале FAM	Ожидаемый результат в канале HEX
NTC	$C_t \geq 40$ или не определяется	$C_t < 20$
ПКО	$C_t < 25$	$C_t < 20$

При несоответствии хотя бы одного из результатов этим критериям необходима повторная постановка (см. далее пункт «Решение проблем»).

4. Оцените результаты специфической реакции (канал FAM) в исследуемых образцах:

Результат в канале FAM	Заключение
$C_t \leq 38$	ДНК <i>Mollicutes</i> выявлена
$38 < C_t \leq 40$	Результат не может быть интерпретирован однозначно. Необходимо оценить наличие ингибиторов в образце и повторить постановку (см. далее)
$C_t > 40$ или не определяется	ДНК <i>Mollicutes</i> не выявлена. Оцените наличие ингибиторов в образце (см. далее)

5. Оцените результаты амплификации реакции ВК (канал HEX) в образцах, у которых ДНК *Mollicutes* не выявлена или результат не может быть интерпретирован однозначно:



См. «Решение проблем»

\*Если реакция ВК исследуемого образца не отстает от ВК контрольных образцов, при этом Ct в канале FAM лежит в области 38-40, ДНК *Mollicutes* выявлена со сниженной достоверностью (менее 95 %). Необходимо повторить постановку, увеличив количество образца в реакции.

6. Причиной выявления ДНК *Mollicutes* может являться загрязнение рабочего пространства или контаминация ДНК микоплазмы реактивов для культивирования клеток.

В этом случае рекомендуется дополнительно проанализировать смывы с поверхностей и пипеток, а также используемые реагенты для культивирования, в состав которых входят компоненты животного происхождения (сыворотка, трипсин и др).

## XV. Решение проблем

Образец	Значение Ct	Заключение	Решение:
NTC	$Ct (FAM) < 40$	Контаминация реакции амплификации целевым ПЦР-продуктом или геномной ДНК <i>Mollicutes</i>	Провести деконтаминацию рабочего пространства, после чего аккуратно переставить ПЦР. В случае повторного возникновения проблемы – заменить набор реактивов.
NTC, ПКО	$Ct (HEX) > 20$	Ошибка в постановке эксперимента или потеря качества одного из компонентов набора	Аккуратно переставить ПЦР. В случае повторного возникновения проблемы – заменить набор реактивов.
		Неэффективная амплификация: ошибка в постановке эксперимента или потеря качества одного из компонентов набора	
ПКО	$Ct (FAM) > 25$		
Исследуемый образец	$Ct (FAM) > 40$ , при этом $Ct (HEX)$ образца $> Ct (HEX)$ НТС на 2 цикла и более		Если: $Ct (HEX) - Ct (HEX) \text{ образца} - ПКО = 2$ , образец можно разбавить в два раза водой для ПЦР и повторить постановку. Если: $Ct (HEX) - Ct (HEX) \text{ образца} - ПКО > 2$ , образец необходимо переочистить или выделить ДНК повторно.
		В образце присутствуют ингибиторы ПЦР	

## Наборы и сервисы Евроген

**Н** >>> – ссылка на страницу НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н** >>>

**С** >>> – ссылка на страницу СЕРВИСА

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н** >>>

Синтез и амплификация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Клонирование ДНК **Н** >>> **С** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **Н** >>>

Оценка ДНК **Н** >>>

Нормализация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Практикум по геной инженерии **Н** >>>

Генотипирование **Н** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **С** >>>

NGS секвенирование **С** >>>

Синтез генов **С** >>>

Сайт-направленный мутагенез **С** >>>

Синтез органических соединений **С** >>>

**Консультация по продуктам:** [support@evrogen.ru](mailto:support@evrogen.ru)

**Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)**

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