



支原体检测试剂盒-qPCR探针法

Mycoplasma detection kit -qPCR probe method

(详细说明书)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: MYCO-QPCR -48
MYCO-QPCR -96

目录 CONTENTS

内容	页码
试剂盒介绍	1
试剂盒组成	1
储存	1
自备材料	1
相关设备	2
操作步骤	2
使用建议	5
注意事项	6

试剂盒介绍

Introduction

在细胞培养中，支原体污染是常见问题。本试剂盒采用支原体特异性引物和支原体特异性荧光探针（报告基因为 FAM）利用 qPCR 技术，可检测约 200 种支原体、螺原体、无胆甾原体 DNA，包括但不限于 (1) *Acholeplasma laidlawii*, (2) *M. arginini*, (3) *M. pneumoniae*, (4) *M. hyorhinitis*, (5) *M. orale*, (6) *M. fermentans*, (7) *M. gallisepticum*, (8) *M. synoviae*, (9) *Spiroplasma citri*, (10) *M. arthritis*, (11) *M. genitalium*, (12) *M. hominis*, (13) *M. penetrans*, (14) *M. salivarium*, (15) *Ureaplasma urealyticum*, (16) *M. bovis*, (17) *M. hyopneumoniae*, (18) *M. pirum*，特异性强，检测结果与培养法（药典标准）高度一致。

试剂盒内同时含有内部质控（IC）和相应的引物和荧光探针（报告基因为 VIC），用于监控支原体 DNA 提取和 qPCR 扩增的效率。内部质控（IC）可在 PCR 扩增反应阶段加入，以判断待检样品对扩增反应是否存在抑制，防止假阴性结果的产生。

本试剂盒可用于检测一切可能含支原体的样品，比如：（1）体外细胞培养的上清、主细胞库、工作细胞库、病毒种子批以及细胞制品；（2）血清；（3）各种体液，如唾液、尿液、鼻腔分泌物等；（4）别的液体样品。本产品仅供研究使用。

试剂盒组成

Contents

名称	MYCO-QPCR -48	MYCO-QPCR -96
内部质控（IC）	500 μ L	500 μ L \times 2
阳性质控（PC）	20 μ L	20 μ L \times 2
探针法溶液A	400 μ L	400 μ L \times 2
探针法溶液B	60 μ L	60 μ L \times 2

储存

Storage

-20°C 保存，有效期 2 年。

自备材料

Self-supplied material

1、1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管

- 2、八联管或 96 孔 qPCR 板
- 3、1000 μL ，100 μL ，10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 4、PCR 水

相关设备

Equipment

- 1、荧光定量 PCR 仪 (FAM和VIC两通道)
- 2、超净台或生物安全柜
- 3、迷你离心机
- 4、微孔板离心机
- 5、漩涡振荡器
- 6、1000 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪

操作步骤

Steps

1. 样本处理 (推荐)

- 取细胞培养液100 μL ~1000 μL 到1.5 mL离心管内，在普通台式离心机上1000 rpm (大约 150 g) 低速离心 5 分钟，将离心后的上清转移到另一个离心管内，丢弃细胞沉淀。
- 将上清继续 13,000 rpm (约 16000 g) 高速离心 10 分钟，小心吸走全部上清 (为避免碰到底部沉淀，可以保留底部 3~5 μL 液体)，用 50 μL TE buffer (样品可以长期保存) 或者去离子水 (样品比较不稳定，只适合当天或短期内检测使用) 重悬沉淀 (沉淀中含有支原体)，吹吸均匀。
- 至此，该样品可以直接进行检测，也可以进行热处理后再检测 (热处理后，样品保存更稳定)。

热处理具体如下：95 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 5 minutes，简单离心 (1000 g, 5 seconds) 后，取上清进行检测。(样品或经过磁珠法等DNA提取后作为待测液，提取支原体DNA时建议加入内部质控 IC 10 μL 一同提取，或取细胞培养液直接95 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 10 分钟后作为待测液)

2. 检测反应

- 反应孔数：(推荐，若无阴性质控样品NCS和阳性质控样品PCS也应做无模板对照 NTC和阳性质控PC)

反应孔数 (一般做2 个重复孔)

无模板对照 NTC

2 个

阴性质控样品NCS	2个
阳性质控样品PCS	2个
阳性质控PC	2个
待测样品N个	N * 2个

- 配置反应体系 (25 μ L) :

组分	单孔用量
探针法溶液A	7.5 μ L
探针法溶液B	1 μ L
内部质控 (IC) *	0或1 μ L
待测样本**	x μ L
纯水或PCR水	Up to 25 μ L

*若样品在提取DNA过程中加入内部质控 (IC) , 反应无需再加入内部质控 (IC)
 **待测样本X=2 ~10 μ L (经过DNA提取后的样品建议加10uL, 其他样品建议加2uL) ;
 无模板对照组 (阴性对照) 用PCR水补齐到25 μ L,
 阳性对照组加入1 μ L阳性质控 (PC) 。

- 实时荧光定量 PCR 扩增:
 PCR管混匀, 快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪内, 如下实时荧光定量 PCR 扩增程序设置:

步骤	作用	循环数	温度	时间	收集荧光信号
01	预变性	1 cycle	98 °C	10 sec	否 (No)
02	正式扩增 (需要收集荧光)	45 cycles	98 °C 60 °C	10 sec 45 sec	否 (No) 是 (Yes)

注: 支原体检测荧光通道选择 FAM (Reporter: FAM, Quencher: None) ; 内部质控 (IC) 检测荧光通道选择VIC (Reporter: VIC, Quencher: None) ; 反应体积 (Sample Volume) 为 25 μ L; 若有参考荧光 (Passive Reference) 选择 None。

3. 判定标准

① 质控结果分析：

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
NTC (必做)	2复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
PC (必做)	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
NCS (可选)	2复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
PCS (可选)	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增

*质控标准应基于实验室验证数据，可从满足检测限要求考虑。

** NTC：无模板对照；PC：阳性质控；

NCS：阴性对照样本，实验室自备；

PCS：阳性对照样本，实验室自备。

②待测样品检测结果判定参考表（待测样品有可能出现以下 4 种组合：）

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上Ct<40 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

* VIC 信号如果有抑制，需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。

- 阳性对照管：其 FAM 通道有典型的 S 型扩增曲线（即指数扩增），其 VIC 通道的扩增线呈直线或者 S 型曲线。
- 阴性对照管：其 FAM 通道的扩增线呈直线（或斜的直线），其 VIC 通道应该有典型的 S 型扩增曲线。
- 如果阳性对照管、阴性对照管同时满足上述条件，则说明本次实验结果有效，否则实验结果无效。
- 待测样品管只要 FAM 通道有 S 型扩增曲线（组合 1 和组合 2）就说明有支原体污染。因为外加的内部质控（IC）分子数极少，如果支原体含量很大时，内部质控（IC）的扩增会被彻底抑制，导致内参 VIC 通道无信号（组合 2）。
- 如果待测样品管 FAM 通道呈直线，而 VIC 通道有 S 型曲线（说明样品的 DNA 提取过程和 PCR 扩增过程均正常）（注：由于提取过程中，外加的内部质控（IC）分子数较少，作为内部质控（IC）的 VIC 通道的 Ct 值会比较大），说明样品无支原体。如果阳性对照管和阴性对照管结果正常，而待测样品管 FAM 通道和 VIC 通道均呈直线，说明 PCR 被抑制。如果样品是经过提取的，最可能原因是：DNA 洗脱前，吸附膜中的乙醇没有挥发彻底（解决方法：洗脱前，将吸附柱放 50-65°C 烘箱至少 15 分钟）。如果样品是没有经过提取的，则样品本身含有抑制 PCR 的成分（解决方法：将样品进行 DNA 提取或者离心清洗）。

注 1：阳性结果需要结合扩增曲线和 Ct 值进行判断，不能只看 Ct 值（因荧光值的波动，个别阴性样品虽然扩增曲线基本呈直线，但可能会出现 Ct 值，此类样品不能判断为阳性。反之亦然：有些样品有 S 型曲线，但是因为荧光值波动，导致没有 Ct 值，此类样品不能判断为阴性）

注 2：结果判断完后，将 PCR 八联管用自封袋密闭后，进行适当处理。

使用建议

suggestion

- 1、贴壁细胞需培养至少 3 天且汇合度 90%，取细胞培养液上清检测。
- 2、悬浮细胞需培养至少 3 天，1000 rpm (约 150 g) 离心 5 分钟，目的是去除细胞，减少对支原体检测的影响，取细胞培养液上清检测。所以离心力要严格控制在 150~200 g，该离心力下，哺乳动物细胞将被沉淀下来而支原体不会。如果错误使用更高的离心力将可能导致支原体也被离心下来，从而导致假阴性。
- 3、收集的待测细胞培养液样品如果不立即检测，请放于 -20°C 或 -80°C 冰箱保存，不得放于室温或 4°C 冰箱。样品在 -20°C 至少可以保存一个月，在 -80°C 可以长期保存。
- 4、关于阳性对照和无模板对照建议至少每 1~2 周检测一次。
- 5、本试剂盒提供的阳性对照仅含有 DNA，并不会造成支原体污染。无模板对照使用 PCR grade water 或者灭菌的 PBS 即可。
- 6、建议加样区与观察结果区，分区操作。试剂盒灵敏度非常高，请注意避免扩增产物（DNA）对下次试验的污染。（avoid carry-over contamination）

注意事项

Notes

1、防 DNA 污染注意事项：

(1) 强烈建议所有操作（特别是 qPCR 体系配制步骤和吸取试剂盒中试剂的时候）使用进口滤芯吸头（比如：Axygen 滤芯吸头）进行操作，以免试剂被污染。如果没有滤芯吸头，至少应该使用新开封的吸头。

(2) 必须确保使用的移液枪本身没有残留的支原体。因此，最好使用全新购买的移液枪。如果没有新购买的移液枪，至少应该使用以前没有进行过细胞操作的移液枪。因为进行过细胞培养的移液枪极有可能被含支原体的培养液污染（如细胞培养时，不小心将含支原体污染的培养液吸入移液枪的枪体内）。由于本试剂盒非常灵敏，移液枪中吸附的支原体有可能造成不必要的假阳性。

(3) 样品前处理的各类吸头、离心管，以及吸取阳性对照 DNA、待测样品 DNA 的吸头，务必小心处理，请将其装入含有半瓶水的带盖的、可密封的瓶子内，全部样品吸取完后，盖上瓶盖，以防止阳性 DNA 的挥发，造成环境的污染，进而造成假阳性。

(4) 整个操作过程，最好不要说话，因为人的口腔和唾液都是带支原体的。

(5) 反应后，请勿打开反应管的盖子，否则有可能造成检测环境的污染。结果判断完后，将其用自封袋密闭后，进行适当处理。

2、实验室必须严格分房间操作（本试剂盒建议在有窗户、通风良好的普通房间内操作，请勿在密闭的房间操作。请勿在细胞培养间进行该步骤的操作，因为细胞培养间支原体污染概率很高）：

- 试剂配制房间 1：专门进行定量 PCR 体系的配制（建议该房间全部使用进口滤芯吸头。）
- DNA 提取房间 2：专门进行支原体 DNA 的提取；
- DNA 加样房间 3：专门进行定量 PCR 体系配制后，添加待测样品、阳性对照、阴性对照等操作；
- PCR 扩增房间 4：进行实时荧光 PCR 扩增检测。

注：如果房间紧张，可以考虑将房间 2、房间 3 合并在一个房间，而房间 1 和房间 4 必须独立。各房间物品（包括移液枪）均为专用，不得交叉使用。

3、如果出现 qPCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制时（qPCR 结果：支原体通道和内参对照通道均无扩增曲线），可以采取以下几种措施：

(1) 将取样的时间提前到换液后 2 天或 3 天，此时细胞上清的 PCR 扩增抑制物相对比较少，一般不会产生严重的抑制。据我们测试，换液后 5 天，PCR 扩增抑制物就已经大量积累。

(2) 用 PBS 对待测样品进行离心清洗，去除样品中的抑制物。具体方法如下：取 1 mL 细胞上清，先 13000 rpm 离心 10 minutes，吸走 950 μ L 上清；加 PBS 950 μ L，再次离心，吸走 950 μ L 上清；再加 PBS 950 μ L，第三次离心，小心吸走全部上清（为避免碰到底部沉淀，可以保留底部 3-5 μ L 液体），用 50 μ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8 重悬沉淀，95 $^{\circ}$ C 加热处理 5 minutes，简单离心（1000 g, 5 seconds）后，取上清进行检测。但是该方法有如下缺点：第一，如果样品支原体含量较少，离心清洗可能导致漏检，因为离心清洗过程中，可能导致支原体部分丢失。第二，个别样品，即使经过上述清洗也无法彻底去除抑制剂。

(3) 使用支原体基因组 DNA 抽提试剂盒（推荐使用磁珠法试剂盒，抽提细胞上清的支原体 DNA 后再进行 PCR 鉴定。为了预防 PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制的问题，也可以考虑将所有待测样品全部进行离心清洗或者 DNA 提取后，再使用本试剂盒进行检测。

(4) 如发现细胞被支原体污染，可使用本公司提供的细胞专用支原体清除和预防试剂。

核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

EZ_{assay} 深圳易致生物科技有限公司

 www.ezassay.com
 info@ezassay.com