

《PCR 法支原体检测试剂盒》说明书 (版本 20210203c)

【本说明书会不定期更新, 每次收到新的产品时, 请到本公司网站重新下载最新版本!】

货号

PM008

包装规格

100 次/盒

储存条件

该产品在常温或随冰袋运输, 收到产品后, 请立即放-20℃冰箱低温保存。该条件下, 至少 5 年内有效。

产品用途

《PCR 法支原体检测试剂盒》(PCR Mycoplasma Detection Kit) 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; (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。

产品简介

哺乳动物细胞的培养, 支原体 (*Mycoplasma*) 污染是个世界性的问题。支原体污染几乎可以改变细胞的所有参数, 导致实验结果的不准确、甚至完全错误 (支原体污染对细胞的详细危害, 请参考本公司的网站: www.yisemed.com)。从 2013 年开始, 《Nature》期刊已正式要求投稿的文章, 如涉及细胞培养都要进行支原体检测。相信会有越来越多的高水平期刊将做出同样的支原体检测要求。

培养法是相对可靠的支原体检测技术, 但是该方法非常耗时的, 需要数周, 不适合作为细胞培养液中支原体污染的快速检测。此外, 通过固体培养法无法检测污染细胞的一种最常见的支原体, 即猪鼻支原体 (*M.Hyorhinis*)。这是因为猪鼻支原体无法在支原体固体培养基上形成可见的菌落。而猪鼻支原体约占所有支原体污染的 20-50%。

有的实验室使用荧光染色法检测支原体, 但是该方法灵敏度太低, 而且严重依赖实验人员的经验, 实验的稳定性较差。此外, 当该方法检测成阳性时, 细胞经常已经严重污染。

培养法和荧光染色法虽然是我国药典收录的支原体检测方法, 但是因为其各自都有明显的缺点, 不适合作为支原体快速检测的方法。

本公司目前已经开发出四种不同原理的快速支原体检测试剂盒, 分别是: 《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》、《发光法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》, 其各有自己的优缺点 (详情请参考本公司网站)。

《PCR 法支原体检测试剂盒》具有 100% 支原体识别率、灵敏度极高、含内参条带从而可以区分真阴性样品和假阴性样品、无需配套昂贵的荧光定量 PCR 仪等优点, 是普通实验室支原体检测最常用的方法之一。

《PCR 法支原体检测试剂盒》主要缺点: (1) 由于细胞代谢可能会产生抑制 PCR 的物质, 样品如果不进行前处理, 可能产生假阴性; (2) PCR 后需要进行琼脂糖凝胶电泳, 相对耗时较多。

经测试, 本公司开发的《PCR 法支原体检测试剂盒》至少可以识别在体外细胞培养中曾经报道出现的 20 种支原体, 根据文献报道, 这些支原体基本上占污染细胞的支原体种类的 100%。具体如下: (1) *M. hyorhinis*、(2) *M. fermentans*、(3) *M. arginini*、(4) *M. hominis*、(5) *M. orale*、(6) *M. salivarium*、(7) *M. pirum*、(8) *A. laidlawii*、(9) *M. agalactiae*、(10) *M. bovis*、(11) *M. bovoculi*、(12) *A. axanthum*、(13) *M. buccale*、(14) *M. pneumoniae*、(15) *M. arthritis*、(16) *M. pulmonis*、(17) *M. gallisepticum*、(18) *M. gallinarum*、(19) *M. canis*、(20) *Ureaplasma urealyticum* (注: *M.* 为 *Mycoplasma* 的缩写; *A.* 为 *Acholeplasma* 的缩写)。根据支原体 DNA 的序列, 本试剂盒可以识别 100 多种至今已发现的支原体, 具有广谱的识别能力。如果客户发现除上述 20 种支原体外, 还有其他的支原体也会污染体外培养的细胞, 或者客户纯粹就是想检测其他的支原体, 请告诉我们支原体的名称, 我们将进行序列比对, 然后告诉你本试剂盒是否可以识别。

《PCR法支原体检测试剂盒》检测灵敏度:经测试,配套使用Takara公司的Ex Taq Hot Start version,本试剂盒的检测下限为6-20个copies左右。即PCR扩增时,如果样品DNA加入量为2 μL,则本试剂盒的最高检测灵敏度为3-10个copies/μL。与本公司的《探针法支原体检测试剂盒》的最高检测灵敏度基本持平或略低一点。可以通过离心浓缩、提取支原体基因组DNA、增加每个反应管中的DNA加入量等措施,其检测灵敏度可以在此基础上继续提高10-1000倍。

此外,作为支原体检测领域的共识,单独使用任何一种支原体检测方法,都无法做到100%正确,既不会漏检(假阴性),也不会多检(假阳性)。严格的支原体检测,至少需要使用两种(最好使用三种)不同原理的支原体检测方法同时进行检测,才能使检测结果接近100%正确。

如果您想得到100%正确的支原体检测结果(比如,开展细胞治疗的客户,进行干细胞培养的客户,生产血清、胰酶、培养液的客户,出售各种原代培养细胞系和肿瘤细胞系的客户等),任选本公司生产的《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR法支原体检测试剂盒》、《发光法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》中的两种进行检测,将会得到比较满意的结果。如果几种不同支原体检测方法的检测结果一致,正确率几乎就是100%。

试剂盒组成

- (1) 支原体引物和内参(100次): 206 μL;
 - (2) 阳性支原体DNA: 50 μL;
 - (3) 去离子水: 1.8 mL(请使用普通蒸馏水或去离子水,不能使用去内毒素的水)。
- 注意1:以下试剂需要自己准备:(1) Taq DNA聚合酶和2.5 mM的dNTP【推荐使用Takara公司的Ex Taq Hot Start version(首选。货号:RR006A,可用400次)或者Ex Taq酶(货号:RR001A,可用400次),二者均包含2.5 mM的dNTP。】;(2) 6×DNA上样缓冲液【也可以购买本公司生产的5×AgarOrange超级DNA上样缓冲液,该缓冲液已含核酸染料,不需要接触EB等致癌物质!】。
 - 注意2:本试剂盒不能使用Takara公司的普通Taq酶(货号:R001A),经测试:使用该酶的结果非常不稳定,灵敏度也较差。

检测过程

1、待测样品的准备

为了准确判断细胞是否有支原体的污染,待测的细胞培养液样品需要取自换液后培养2-3天且汇合度在90%左右的细胞培养液上清(贴壁细胞)。悬浮培养的细胞也需要在换液传代后,让细胞生长2-3天再取培养液进行检测。可以按照以下两种方法之一进行样品的前处理:

方法一(该方法无法去除可能的抑制物,PCR扩增被抑制的可能性较大):

(1) 取150 μL上述待测样品到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 minutes,取离心后的上清100 μL用于支原体检测,丢弃下层剩余的50 μL(含细胞沉淀)。

(2) 已经离心去除细胞的待测样品可以直接检测,也可以进行热处理后再检测(热处理后,样品保存更稳定),具体如下:95 °C加热处理5 minutes(可以转移到PCR管内,在PCR仪上进行加热处理),简单离心(1000 g, 5 seconds)后,取上清进行检测。

方法二(推荐。该方法不仅可以浓缩支原体从而提高检测的相对灵敏度,还可以去除绝大部分可能的抑制物,PCR扩增被抑制的可能性大幅度降低):

(1) 根据浓缩倍数,可以取100 - 1500 μL上述待测样品到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 minutes,将离心后的上清转移到另一个离心管内,丢弃细胞沉淀。

(2) 将上清继续13000 rpm(约16000 g)高速离心5 minutes,小心吸走全部上清,用50 μL 5 mM Tris-HCl, pH 8.5(样品可以长期保存。推荐)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【如果最初使用了1500 μL的样品,则支原体浓度大约提高了30倍】。

(3) 该重悬后的样品可以直接检测,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 °C加热处理5 minutes(可以转移到PCR管内,在PCR仪上进行加热处理),简单离心(1000

g, 5 seconds) 后, 取上清进行检测。

- 注 1: 这里的细胞培养上清不是指细胞经胰酶消化后的离心上清, 而是指至少培养 2 天后的贴壁细胞培养液上清 (不需要胰酶消化, 也不能取经胰酶消化后的离心上清进行检测) 或悬浮细胞培养液。
- 注 2: 本步骤的低速离心是为了去除哺乳动物细胞, 以排除其不必要的干扰。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。
- 注 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。此外, 为了节约检测成本, 可以将不同时间收集的样品放于 -20°C 或 -80°C 冰箱保存, 而后一起检测。
- 注 4: 如果预期待测样品支原体含量较少 (比如, 低温保存的血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液、生物制品、极个别细胞培养上清等), 可以采取提高检测的灵敏度, 具体方法请看后文注意事项部分: 如果提高本试剂盒检测灵敏度。

2、PCR 体系的配制【本步骤所有操作强烈建议使用进口滤芯吸头 (比如 Axygen 滤芯吸头) 进行操作, 以避免试剂被污染。操作之前, 请认真看完后文的注意事项后, 再进行操作】:

2.1 如果样品总数为 N (N=待测样品数+1 个阳性对照+1 个阴性对照), 请按下表 (表 1) 进行 PCR 体系 (总体积 25 μ L) 的配制:

表 1. PCR 扩增体系的配制 (以使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version 为例举例说明)

	单个样品体积 (μ L)	样品总数	总体积 (μ L)
去离子水	16.375	N	16.375 \times N \times 1.06
Takara 10 \times Ex Taq buffer(含 Mg ²⁺)	2.5	N	2.5 \times N \times 1.06
2.5 mM dNTP	2	N	2 \times N \times 1.06
Takara 5 Units/ μ L Ex Taq Hot Start	0.125	N	0.125 \times N \times 1.06
支原体引物和内参	2	N	2 \times N \times 1.06

- 举例: 1) 如果待测样品为 8 个 (加上 1 个阴性和 1 个阳性对照), 则样品总数为 10 个。去离子水的总体积为 16.375 \times 10 \times 1.06=173.575 μ L; Takara 10 \times Ex Taq buffer(含 Mg²⁺)的总体积为 2.5 \times 10 \times 1.06=26.5 μ L; 2.5 mM dNTP 的总体积为 2 \times 10 \times 1.06=21.2 μ L; Takara 5 Units/ μ L Ex Taq Hot Start 的总体积为 0.125 \times 10 \times 1.06=1.325 μ L; 支原体引物和内参的总体积为 2 \times 10 \times 1.06=21.2 μ L。将上述几种溶液混合均匀即可。
- 注意 1: 总体积中多配制 6% (客户如果觉得该比例不合适, 可以自己调整), 是为了防止移液误差, 以保证每个反应管中的反应液足量。
- 注意 2: 如果有条件, PCR 体系的配制最好在冰上进行操作。
- 注意 3: 本试剂盒不推荐使用 2 \times 的 PCR mixture (内含 Taq 酶、缓冲液和 dNTP), 建议使用 Taq 酶、10 \times Taq 缓冲液和 dNTP 等试剂自己配置 PCR 体系。如果使用 2 \times 的 PCR mixture, 那么 PCR 的反应体系 (25 μ L) 应该按照如下进行配置: 2 \times 的 PCR mixture (12.5 μ L)、支原体引物和内参的体积 (2 μ L)、阳性支原体 DNA 或待测样品的体积 (2 μ L), 然后用去离子水补足到总体积 25 μ L。
- 注意 4: PCR 的反应体积 (25 μ L)、支原体引物和内参的体积 (2 μ L)、阳性支原体 DNA 或待测样品的体积 (2 μ L), 这是经过优化后的最佳体积, 不能随意改变, 否则检测结果容易不稳定。
- 注意 5: 为了避免可能的污染, 收到的支原体引物和内参, 可以适当分装 (比如: 每支 40 μ L) 后冷冻保存。
- 注意 6: 如果使用的是其他 Taq 酶 (前提是: 阴性对照的 586 bp 内参条带必须有一定亮度, 且稳定性良好, 否则不能使用), 酶的加入量需要根据其说明书进行调整, 去离子水的加入量也要相应调整。

2.2 将上述配制好的 PCR 反应体系, 吹打均匀后, 按每管 23 μ L 分装到 0.2 mL 的 PCR 管中。

2.3 待测样品管加入 2 μ L 待测样品, 阴性对照管加入 2 μ L 去离子水 (为防止去离子水被污染, 此处建议使用 20 μ L 移液枪配合 200 μ L 吸头进行吸取操作), 阳性对照管加入 2 μ L 阳性支原体 DNA。每管反应液的总体积为 25 μ L。

- 注: 1) 装有阳性支原体 DNA 的螺口管请不要高速离心, 开盖之前, 只要用手指捏住, 用力甩一下即可。吸取之前, 请吹吸均匀后再吸取。如果不小心高速离心了, 务必吹吸均匀后再吸取。2) 进行反应体系配制的房间, 与样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间最好分开。

3、PCR 设置参数

1 cycle 94 °C for 2 minutes
 40 cycles 94 °C for 15 seconds
 55 °C for 15 seconds
 72 °C for 45 seconds
 1 cycle 72 °C for 5 minutes
 1 cycle 8 °C forever

- 注意: PCR 参数请不要更改, 否则可能导致内参或阳性条带扩增失败。

4、PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

- (1) 配制含溴化乙锭 (EB) 的浓度为 1.5% 的 DNA 琼脂糖凝胶【注: (1) 如果不想接触强致癌物 EB, 可以使用本公司生产的 5×AgarOrange 超级 DNA 上样缓冲液, 使用该产品无需在凝胶中预先加入核酸染料。具体使用方法, 请参见本公司网站的说明书。(2) 琼脂糖凝胶的最佳浓度为 1.5%, 此浓度下, 条带分离效果最好。】
- (2) 往每个扩增后的 PCR 管内加入 5 μL 6×DNA 上样缓冲液。
- (3) 取上述含 DNA 上样缓冲液的 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。
- (4) 当溴酚蓝染料跑出上样孔 3-4 厘米左右时, 停止电泳, 拍照。

结果判断

PCR 扩增的结果有可能出现以下几种情况 (表 2):

表 2. PCR 扩增的可能结果

	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果
586 bp 内参条带	++	-	+	++	++	-
270 bp 左右条带	-	++++	+++	++	+	-
结果图示 (见图 1)	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
支原体污染判断	阴性	极重度污染	重度污染	中度污染	轻度污染	PCR 被抑制

注: “-”代表没有条带; “+”代表有条带; “+”号越多代表条带越强。

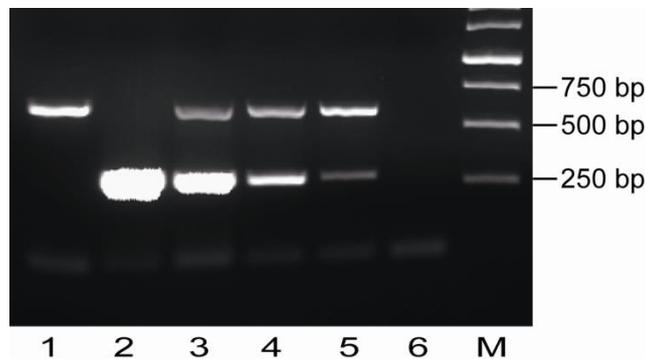


图 1. 支原体 PCR 扩增结果。586 bp 条带为内参条带, 270 bp 左右的条带为支原体特异条带 (各支原体的条带大小会略有不同, 总体在 266-280 bp 之间。注意: 支原体特异条带的大小不会超过该范围。超过该范围的, 就是杂带!)。随着支原体 DNA 模板的增加, 270 bp 左右的条带会逐渐增强而 586 bp 的内参条带会逐渐减弱, 甚至消失。泳道 1: 阴性对照或者没有支原体污染的样品; 泳道 2: 极重度支原体污染样品; 泳道 3: 重度污染样品; 泳道 4: 中度污染样

品; 泳道 5: 轻度污染样品; 泳道 6: PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制, 导致扩增失败。M: DNA marker.

注意事项

1、每次检测都应该设有阴性对照, 作用有:

(1) 由于有效的 PCR 扩增, 阴性对照也会有一条 586 bp 的内参条带, 这样可以保证本试剂盒含有的支原体引物和内参以及自己准备的 Taq DNA 聚合酶, dNTP 等试剂没有问题;

(2) 只有当阴性对照的结果没有出现 270 bp 左右的支原体特异条带时, 其他样品的检测结果才是可信的。

2、每次试验阴性对照中 586 bp 的内参条带都必须出现而且要有一定的亮度, 才说明试验成功。如果阴性对照的内参条带经常没有出现或者非常弱, 说明试验不成功, 这时可以采取以下几个措施:

(1) 请使用普通蒸馏水或去离子水。不能使用去内毒素的水、DEPC 处理的水或者商品化的 DNase/RNase-free 的水, 这几种水都可能会抑制 PCR 扩增的效率。

(2) 请使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version (首选。货号: RR006A, 可用 400 次。)或者 Ex Taq 酶 (货号: RR001A, 可用 400 次)。

(3) 可以尝试增加 PCR 的循环数, 比如: 由原来的 40 个循环, 增加到 45 个循环。

如果采取以上几个措施后, 阴性对照的内参条带仍然经常没有出现或者非常弱, 请联系厂家解决。

3、如果个别样品有非特异性扩增, 请使用 Takara Ex Taq Hot Start version (首选。货号: RR006A, 可用 400 次。)

4、如果直接使用细胞培养液上清进行检测, 而检测结果显示该样品 586 bp 条带和 270 bp 左右的条带都没有出现 (如图 1, 泳道 6) 或者内参条带非常微弱, 在排除 PCR 试剂的问题后 (即阴性对照可以正常扩增), 说明该样品含有抑制 PCR 扩增的代谢产物。

有关 PCR 的扩增会被细胞的代谢产物抑制的问题, Sigma 公司的 LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit (货号 MP0035) 的 PCR 法支原体检测试剂盒说明书中也特别提到了这点, 说明这是一个 PCR 法支原体检测中经常遇到的问题, 其强烈建议用试剂盒进行 DNA 提取后再进行鉴定。这也是 PCR 法支原体检测的致命弱点。

为了克服该问题, 您购买的 PCR 法支原体检测试剂盒, 其扩增产物中必须含有内参 (Internal Control) 条带作为对照【本试剂盒的 586 bp 条带就是内参条带】。否则, 如果没有内参作为对照, 即使样品扩增后没有支原体特异条带, 你也无法确定是因为样品确实没有支原体还是因为 PCR 被细胞的代谢产物抑制导致的假阴性。

如果出现 PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制时, 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 5 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, 吸走全部上清, 用 50 μ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 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 (推荐使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》), 抽提细胞上清的支原体 DNA 后再进行 PCR 鉴定。

(4) 使用本公司生产的《一步法恒温支原体检测试剂盒》或者《发光法支原体检测试剂盒》进行检测, 经测试, 未发现这两种试剂盒会被细胞的代谢产物所抑制。

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。

5、如发现细胞被支原体污染, 本公司提供细胞专用支原体清除和预防试剂, 以及水浴专用杀菌剂和环境专用杀菌剂。

6、防 DNA 污染注意事项:

(1) 强烈建议所有操作全部使用进口滤芯吸头 (比如: Axygen 滤芯吸头) 进行操作, 以免试剂被污染。

- (2) “PCR 体系配制的房间、移液枪” (不要使用细胞培养室的移液枪!) 和“PCR 产物的电泳房间、移液枪”一定要分开, 不能在同一个房间进行, 也不能使用相同的移液枪进行操作。
 - (3) PCR 产物是导致假阳性的最主要原因, PCR 产物不要在 PCR 体系配制的房间中打开。
 - (4) 样品处理的房间和移液枪, 如有条件, 最好也分开。
 - (5) 收到的支原体引物和内参, 可以分装 (比如 40 微升一支) 后保存。
 - (6) 如果发现阴性对照也出现阳性条带, 说明发生 DNA 污染, 必须将 PCR 所有的试剂、引物和水都换新的。
- 7、支原体检测样品可以分成两类: 第一类, 用含血清的培养液培养的哺乳动物细胞上清液, 由于该条件非常适合支原体生长, 培养数天后, 支原体密度一般较高, 可达 $10^{7-9}/\text{mL}$, 可以直接检测。第二类, 低温保存的血浆、血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液等样品, 由于这些样品即使有支原体污染, 支原体含量一般很少, 直接使用快速支原体检测试剂盒进行检测, 往往检测不出来。这些样品建议: (1) 对样品的支原体进行离心浓缩或者使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》将支原体 DNA 浓缩提取, 该两种方法大约可以将检测灵敏度继续提高 10-100 倍。该方法速度快, 当天出结果, 但是可靠性不如后面的培养法。(2) 使用支原体液体培养基 (必须同时接种不含精氨酸和含精氨酸的两种支原体液体培养基) 培养 3-7 天后, 再进行检测。具体方法请参考本公司《发光法支原体检测试剂盒》说明书中最后的注意事项部分。该方法速度较慢, 需要 3-7 天, 但是可靠性高。
- 8、**如何提高本试剂盒检测灵敏度:** 如果期待测样品支原体含量较少 (比如, 低温保存的血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液、生物制品、极个别细胞培养上清等), 可以采取以下几种措施: (1) 通过使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》, 将支原体 DNA 浓缩提取后再进行检测 (提取过程还可以把所有可能的 PCR 抑制剂全部去除), 大约可以将检测灵敏度提高 10-100 倍。(2) 将 PCR 的循环数增加到 45 个循环。(3) 对支原体进行离心浓缩: 取 1 mL 细胞上清, 先 13000 rpm (约 16000 g) 离心 5 minutes, 吸走全部上清, 用 50 μL 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 重悬沉淀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 5 minutes, 简单离心后 (1000 g, 5 seconds), 取上清进行检测。该离心浓缩过程大约可以将检测灵敏度提高 20 倍。(4) 通过调整 PCR 反应体系, 可以继续提高检测灵敏度 10 倍【调整后的 PCR 反应体系如下: PCR 的反应体积为 30 μL 、10 \times Takara Ex Taq buffer(含 Mg^{2+}) 为 3 μL 、2.5 mM dNTP 为 3 μL 、5 Units/ μL Takara Ex Taq Hot Start version 0.125 μL 、支原体引物和内参的体积为 2 μL 、提取纯化后或者离心清洗后的待测样品 DNA 的体积为 20 μL 、阳性对照支原体 DNA 为 2 μL 、体系剩余部分加水补足到 30 μL 】。注意: 没有提取纯化或者离心清洗的待测样品, 不能直接扩大待测样品体积, 否则 PCR 被抑制的可能性将大幅度增加。
- 9、本说明书主要是利用细胞上清进行支原体污染检测, 如果有客户想使用细胞本身而不是细胞培养上清进行支原体污染检测, 请联系我们。