

《一步恒温法支原体检测试剂盒》方法学报告

(版本 20210203c)

1. 产品名称

《一步恒温法支原体检测试剂盒》(One-step Quickcolor Mycoplasma Detection Kit) (货号: MD001)

2. 产品简介

本公司开发的《一步恒温法支原体检测试剂盒》采用独特的恒温基因扩增技术和显色技术,对样品的支原体基因组 DNA 进行恒温扩增,反应完后,通过反应管的颜色即可对结果进行判断。

《一步恒温法支原体检测试剂盒》主要用于检测细胞培养液或别的液体样品中是否含有支原体。本产品仅供科研使用。

3. 产品优点和缺点

《一步恒温法支原体检测试剂盒》有明显的优点: (1) 整个检测过程只需 1 小时,大大缩短了检测时间; (2) 未发现细胞培养液中的 PCR 抑制剂会抑制恒温基因扩增,所以一般无需进行样品的前处理; (3) 恒温基因扩增的灵敏度良好,一般比 30 个循环普通 PCR 法高; (4) 恒温基因扩增的产物无需电泳,可以通过指示剂的颜色变化直接肉眼判断反应结果; (5) 无需用到 PCR 仪、电泳槽、凝胶成像仪等仪器,整个检测过程只需一个水浴锅。

《一步恒温法支原体检测试剂盒》主要缺点: (1) 支原体识别率相对较低,大约只能识别污染细胞所有支原体种类的 99% 左右,还有大约 1% 的支原体可能无法识别,从而导致假阴性; (2) 高浓度的血清和相关血液制品、二价离子和 EDTA 等可能会对显色结果产生干扰(注:可以通过离心清洗去除干扰),导致结果误判。

4. 产品特异性

经测试,本公司开发的《一步恒温法支原体检测试剂盒》可以检测以下 13 种支原体: (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. buccale*、(12) *M. arthritidis*、(13) *M. pulmonis* (注: *M.* 为 *Mycoplasma* 的缩写; *A.* 为 *Acholeplasma* 的缩写)。其中,前 8 种为是最常见的污染细胞的支原体种类,约占污染细胞的支原体的 98% 左右。以上 13 种约占污染细胞的支原体种类的 99% 左右。

5. 产品的灵敏度测试

5.1 灵敏度测试 1 (以质粒为模板):

我们选取了比较有代表性的 4 种支原体 (分别是: *M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *A. laidlawii* 和 *M. pirum*), 使用含相应支原体基因片段的质粒载体,经 DNA 定量后,计算出相应的分子数。

质粒经 4 倍系列稀释【从 4^0 到 4^{-8} 】,进行相应的恒温扩增(每个反应管的 DNA 加入量为 2 μ L,每个稀释度做 2 个重复),并对恒温扩增产物进行拍照。

恒温扩增反应的结果如图 1 所示:

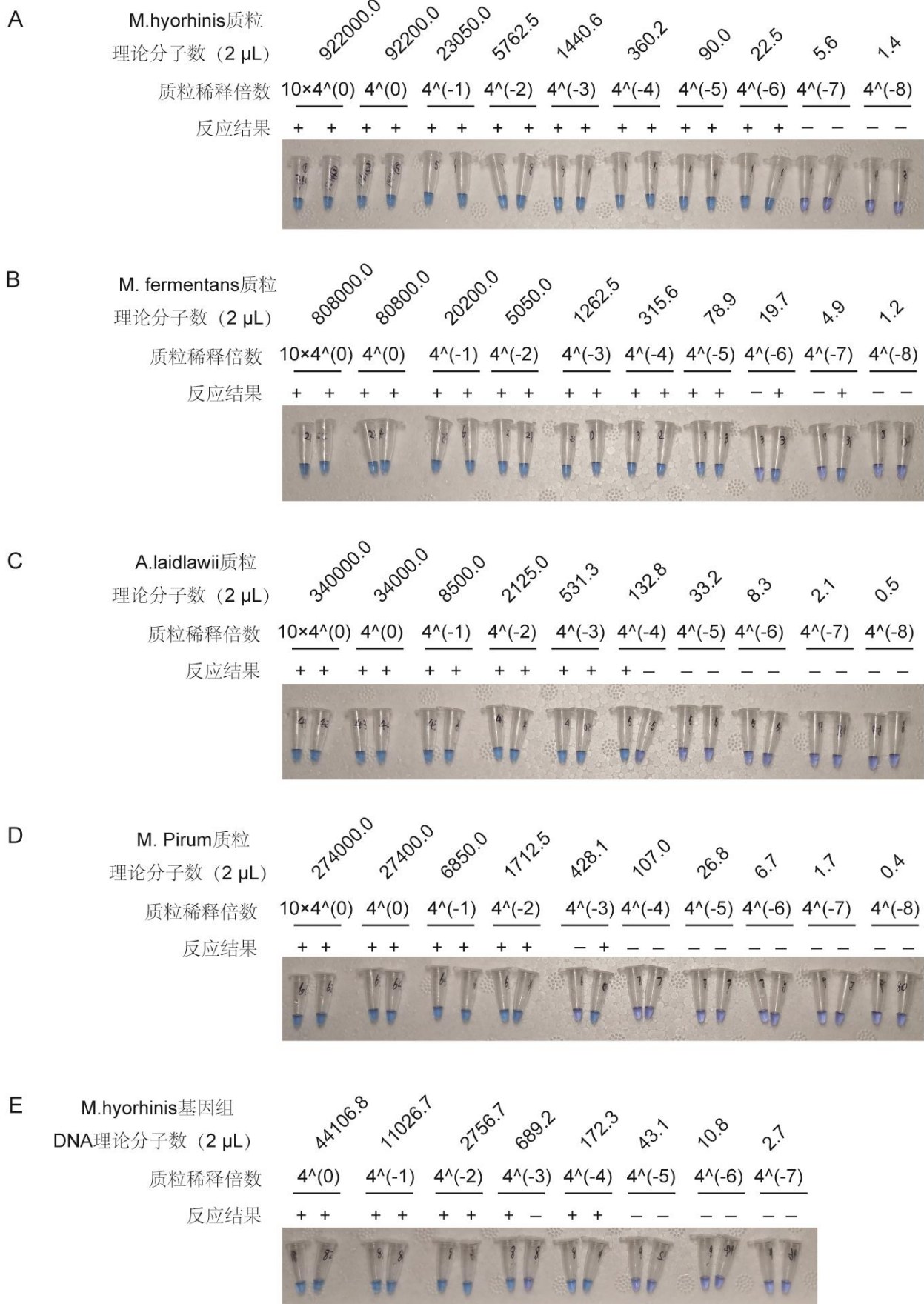


图 1. 四种支原体质粒和一种支原体基因组 DNA 经 4 倍系列稀释的恒温扩增反应结果。每个稀释度做 2 个重复，每个反应管的 DNA 加入量为 2 μ L。从结果可知：《一步恒温法支原体检测试剂盒》的检测下限范围较宽，对于不同的支原体检测下限有较大区别，从最低的大约 20 copies【即大约 10 copies/ μ L】(图 1A 和 1B)到大约 120-400 copies【即大约 60-200 copies/ μ L】(图 1C-1D)。可能的原因是：(1) 恒温扩增需要多条引物同时起作用，而每种支原

体的核酸序列会有所不同, 导致不同支原体的扩增效率有一定区别; (2) 本试剂盒使用了多套不同的引物, 每套引物的扩增效率也会有所区别。我们正在评估是否需要对其扩增效率较低的引物组进行优化升级。如果有优化升级, 后续产品说明书和方法学报告中会有明确说明。

5.2 灵敏度测试 2 (以 *M. hyorhina* 支原体基因组 DNA 为模板):

再者, 我们使用经支原体液体培养基培养数天的 *M. hyorhina* 支原体活菌 (猪鼻支原体) 作为 DNA 模板, 测试《一步恒温法支原体检测试剂盒》的检测灵敏度。

M. hyorhina 支原体基因组 DNA 经 4 倍系列稀释【在每个反应管的 DNA 加入量为 2 μ L 的情况下, 理论分子数从 44106.8 个稀释到最终的 2.7 个】, 进行相应的恒温扩增 (每个稀释度做 2 个重复), 并对恒温扩增产物进行拍照。

恒温扩增反应的结果如图 1E 所示。

从图 1E 结果可知: 《一步恒温法支原体检测试剂盒》对于检测 *M. hyorhina* 支原体基因组 DNA 的检测下限大约是 170 copies【即大约 85 copies/ μ L】, 这与利用质粒所获得的检测下限有较大区别 (*M. hyorhina* 质粒的检测下限大约是 20 copies), 二者有大约 8 倍的差异。可能的原因是: (1) 《一步恒温法支原体检测试剂盒》本身的检测下限波动较大; (2) 质粒的扩增效率比支原体基因组 DNA 的扩增效率可能更高。

5.3 《一步恒温法支原体检测试剂盒》的最高检测灵敏度总结

根据图 1 的结果可知: 在每个反应管的 DNA 加入量为 2 μ L 的情况下, 《一步恒温法支原体检测试剂盒》的最高检测灵敏度 (即检测下限) 大约在 20-400 copies, 即 10-200 copies/ μ L。

6. 如何进一步提高《一步恒温法支原体检测试剂盒》的检测灵敏度

- (1) 可以通过对样品进行支原体基因组 DNA 的提取, 从而提高《一步恒温法支原体检测试剂盒》的相对最高检测灵敏度 (相对提高)。该方法可以提高 10-100 倍的相对检测灵敏度。
- (2) 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 μ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 重悬沉淀, 95 $^{\circ}$ C 加热处理 5 minutes, 简单离心后 (1000 g, 5 seconds), 取上清进行检测。该离心浓缩过程大约可以将相对检测灵敏度提高 20 倍。

7. 本公司四款不同原理的快速《支原体检测试剂盒》的检测灵敏度比较

为了比较本公司开发的四款不同原理的快速《支原体检测试剂盒》【分别是：《一步法恒温支原体检测试剂盒》（简称“一步法”）、《PCR法支原体检测试剂盒》（简称“PCR法”）、《发光法支原体检测试剂盒》（简称“发光法”）和《探针法支原体检测试剂盒》（简称“探针法”）】的检测灵敏度高低，我们使用了以下两种DNA作为模板：（1）含 *M. hyorhinitis* 基因片段的质粒【由于“发光法”只能检测活菌，该模板只比较了另外三种试剂盒】；（2）经支原体液体培养基培养数天的 *M. hyorhinitis* 支原体活菌（猪鼻支原体）。

比较结果如下表所示：

上海易色医疗科技有限公司四款快速《支原体检测试剂盒》检测灵敏度比较										
模板DNA类型	稀释倍数	理论分子数	探针法 (QM016)		PCR法 (PM008)		一步法 (MD001)		发光法 (LM009)	
			测试1	测试2	测试1	测试2	测试1	测试2	测试1	测试2
			Ct1	Ct2	电泳条带	电泳条带	反应管颜色	反应管颜色	样品与阴性比值	样品与阴性比值
M. hyorhinitis 质粒 (初始分子数: 92200.0)	4 ⁰ (-1)	23050/2 μL	25.04	26.32	+++	+++	+	+		
	4 ⁰ (-2)	5762.5/2 μL	28.40	27.95	+++	+++	+	+		
	4 ⁰ (-3)	1440.6/2 μL	30.47	29.66	+++	+++	+	+		
	4 ⁰ (-4)	360.2/2 μL	32.00	32.78	++	++	+	+		
	4 ⁰ (-5)	90.0/2 μL	36.28	32.85	++	++	+	+		
	4 ⁰ (-6)	22.5/2 μL	35.68	35.76	+	+	+	+		
	4 ⁰ (-7)	5.6/2 μL	37.85	39.68	—	+	—	—		
	4 ⁰ (-8)	1.4/2 μL	—	—	—	—	—	—		
M. hyorhinitis 基因组 (初始分子数: 44106.8)	4 ⁰ (-1)	11026.7/2 μL	28.04	27.03	+++	+++	+	+		
	4 ⁰ (-2)	2756.7/2 μL	29.22	29.69	+++	+++	+	+		
	4 ⁰ (-3)	689.2/2 μL	33.08	31.47	++	++	—	+		
	4 ⁰ (-4)	172.3/2 μL	33.96	34.11	++	++	+	+		
	4 ⁰ (-5)	43.1/2 μL	34.98	37.50	—	+	—	—		
	4 ⁰ (-6)	10.8/2 μL	39.04	—	+	—	—	—		
	4 ⁰ (-7)	2.7/2 μL	—	—	—	—	—	—		
M. hyorhinitis 活菌 (初始活菌浓度: 2.2×10 ⁶ /μL)	10 ⁰ (0)	2.2×10 ⁶ /μL							37.61	36.39
	10 ⁰ (-1)	2.2×10 ⁵ /μL							17.60	14.77
	10 ⁰ (-2)	2.2×10 ⁴ /μL							3.11	2.81
	10 ⁰ (-3)	2.2×10 ³ /μL							1.25	1.22
	10 ⁰ (-4)	2.2×10 ² /μL							1.03	1.01
	10 ⁰ (-5)	2.2×10 ¹ /μL							0.99	1.02
	阴性对照	0							1.00	1.00

说明：四款快速《支原体检测试剂盒》检测灵敏度比较。从本表可知：（1）“探针法”的检测灵敏度最高，其检测下限可以达到 5.6-10.8 copies/2 μL；（2）其次是“PCR法”，与“探针法”的最高检测灵敏度基本持平或略低一点；（3）“一步法”的检测灵敏度比“PCR法”和“探针法”都要低，其检测下限大约为 22.5-172.3 copies/2 μL；（4）“发光法”的检测灵敏度最低，其检测下限（即需要样品的发光值与阴性对照的发光值的比值大于 1.2）大约为 2200 个活菌/μL【10⁰(-3)稀释度】。