

**【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

QM016

## 包装规格

50 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℃冰箱低温避光保存。该条件下，至少 5 年内有效。

## 产品用途

《探针法支原体检测试剂盒》（qPCR Mycoplasma Detection Kit with Probe）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](http://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，当检测成阳性时，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》，其各自都有自己的优缺点（详情请参考本公司网站）。

《探针法支原体检测试剂盒》具有 100%支原体识别率、最高的检测灵敏度和最高的检测正确率等一系列优点，该方法被认为是支原体快速检测的金标准。如果您实验室已经拥有（或者打算购买）荧光定量 PCR 仪，我们强烈推荐您选择《探针法支原体检测试剂盒》。

经测试，本公司开发的《探针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）*Acholeplasma laidlawii*、（9）*M. agalactiae*、（10）*M. bovis*、（11）*M. bovoculi*、（12）*Acholeplasma 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）。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。此外，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。

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) 探针法溶液 1P: 460  $\mu$ L (50 次)，含引物和荧光探针。
  - (2) 探针法溶液 2T: 53  $\mu$ L (50 次)，为酶溶液。
  - (3) 阳性支原体 DNA: 50  $\mu$ L
  - (4) 去离子水: 1.2 mL
- 注：本试剂盒必须进行样品 DNA 提取后，再进行检测。推荐使用本公司的《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》（货号：MG015）。该《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》的操作方法和试剂配方根据支原体的特点做了专门的优化和调整，其洗脱液与本公司的所有基于核酸扩增技术的支原体检测试剂盒完美兼容【包括：《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》】。如果是其他公司 DNA 提取试剂盒的洗脱液，当反应体系中 DNA 量加大后（比如反应体系中 DNA 加入量由 2  $\mu$ L 变为 20  $\mu$ L 时）有可能会影响到核酸的 PCR 扩增效率。

### 检测过程

#### 1、待测样品 DNA 的提取：

由于《探针法支原体检测试剂盒》扩增体系中没有内参条带，很多样品（比如：培养很多天的细胞上清、血清、血浆等）由于含有抑制 PCR 扩增的成分，如果直接检测，很有可能产生假阴性结果，而本试剂盒无法区分真阴性结果和假阴性结果。所以本试剂盒必须进行样品 DNA 提取后，再进行检测。提取 DNA 的过程有两个作用：（1）可以完全去除所有可能抑制 PCR 扩增的成分，保证后续定量 PCR 扩增的正常进行；（2）具有浓缩支原体 DNA 的作用，可以提高相对检测灵敏度 10-100 倍。

样品 DNA 的提取推荐使用本公司的《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》（货号：MG015）。如果使用其他公司的 DNA 提取试剂盒，必须测试一下：当 PCR 反应体系中 DNA 加入量为 20  $\mu$ L 时，其洗脱液是否会抑制 PCR 扩增的效率。

不同样品支原体基因组 DNA 的提取步骤，请参考本公司的《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》的说明书。

#### 2、荧光定量 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 将探针法溶液 1P、阳性支原体 DNA、去离子水从 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中取出，室温融化后，冰上放置待用。探针法溶液 2T 开盖之前，请高速离心一下（5000 rpm，离心 1 分钟）。探针法溶液 2T 不能在室温放置，可以在 -20  $^{\circ}$ C 冰箱直接吸取。荧光定量 PCR 体系的配制应该在冰上进行操作。

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），则反应体系的配制如下：

	单个样品体积	样品总数	总体积
探针法溶液 1P	9 $\mu$ L	N	9 $\times$ N $\times$ 1.06 $\mu$ L
探针法溶液 2T	1 $\mu$ L	N	1 $\times$ N $\times$ 1.06 $\mu$ L

- 注：总体积中多配制 6%（该比例客户如果觉得不合适，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。
- 举例：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。探针法溶液 1P 的总体积为 9 $\times$ 10 $\times$ 1.06=95.40  $\mu$ L。探针法溶液 2T 的总体积为 1 $\times$ 10 $\times$ 1.06=10.60  $\mu$ L。将溶液混合均匀即可。

2.2 将上述配制好的 PCR 反应体系，吹打均匀后，按每管 10  $\mu$ L 分装到荧光定量 PCR 八联管中。

2.3 待测样品管加入 20  $\mu$ L 提取好的待测样品 DNA，阴性对照管加入 20  $\mu$ L 去离子水，阳性对照管加入 18  $\mu$ L 去离子水和 2  $\mu$ L 阳性支原体 DNA。每管反应液的总体积为 30  $\mu$ 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，否则阳性对照结果可能异常。
- 注 2：如果待测样品使用的是本公司的《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》（货号：MG015）提取的 DNA，待测样品管可以直接加入 20  $\mu$ L 提取好的 DNA（因为该试剂盒配套的洗脱液与本公司的所有基于核酸扩增技术的支原体检测试剂盒完美兼容）。如果使用其他公司的 DNA 提取试剂盒：
  - （1）必须测试一下，当 PCR 反应体系中 DNA 加入量为 20  $\mu$ L 时，其洗脱液是否会抑制 PCR 扩增的效率；
  - （2）如果不测试，待测样品 DNA 加入量可以调整为 2  $\mu$ L，同时补加 18  $\mu$ L 去离子水。

2.4 盖上荧光定量 PCR 八联管盖子，去除反应管中的大气泡，3000-6000 rpm 离心 30 sec，。

- 注：定量 PCR 八联管的封盖过程，应该佩戴全新的一次性 PE 手套进行操作，避免裸手接触定量 PCR 八联管。

### 3、实时荧光定量 PCR 扩增：

将 PCR 八联管放入荧光定量 PCR 仪内，设置如下实时荧光定量 PCR 扩增程序：

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	95 $^{\circ}$ C	30 sec	否
2	45 cycles	95 $^{\circ}$ C	10 sec	否
		60 $^{\circ}$ C	35 sec	是

注：荧光通道选择 FAM (Reporter:FAM, Quencher: None)；反应体积 (Sample Volume) 为 30 $\mu$ L；参考荧光 (Passive Reference) 选择 None（只适用 ABI 仪器）。

### 4、结果分析：

#### 4.1 ABI StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪基线和阈值设定方法：

（1）基线 (Baseline) 的设定：可以将 Auto baseline 前面的  去掉，然后手动设置基线的起点为 5，终点为 14。

（2）阈值 (Threshold) 线的设定：不同通道的阈值应该分别设定。设定某个通道阈值线时，首先选中含阴性对照的若干个样品，去掉仪器勾选的自动 Threshold 线，将其选项“Auto”改为“Auto”，然后手动调整阈值线，以阈值线刚好超过正常阴性对照 FAM 通道扩增曲线（无规则噪音线）的最高点为准。

#### 4.2 实验有效性判断：

阳性对照 FAM 通道有典型的 S 型扩增曲线（即指数扩增）且 Ct 值 $\leq$ 35，同时阴性对照的扩增线呈直线且无 Ct 值。如果阳性对照和阴性对照同时满足上述条件，则实验结果有效，否则实验结果无效。

#### 4.3 待测样品结果判断：

- (1) 阳性结果：待测样品有典型的 S 型扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 40;
  - (2) 阴性结果：待测样品扩增线呈直线（即无明显的指数扩增，荧光信号始终无明显变化）且无 Ct 值；
  - (3) 可疑结果：待测样品扩增线介于 S 型曲线和直线之间。
- 注：结果判断完后，将 PCR 八联管用自封袋密闭后，进行适当处理。

### 注意事项

1. 实验全过程，应该佩戴一次性手套操作。
2. 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。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。
3. 实验室必须严格分房间操作：

DNA 提取房间 1：专门进行支原体 DNA 的提取；

试剂配制房间 2：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。本试剂盒在普通房间内即可进行操作。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）；

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 1、房间 3、房间 4 合并在一个房间，而房间 2 必须独立。各区物品（包括移液枪）均为专用，不得交叉使用。
4. 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  $10^{7-9}$ /mL，建议直接检测。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）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，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，但是可靠性更高。
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。
6. 本试剂盒与 Sigma 公司的 Lookout Mycoplasma qPCR Detection Kit（货号：MP0040A）原理一样，可以替代后者用于细胞培养上清的支原体检测。并且本试剂盒由于在定量 PCR 反应体系中加入的 DNA 体积是 20  $\mu$ L，而 Sigma 公司的 Lookout Mycoplasma qPCR Detection Kit 在定量 PCR 反应体系中加入的 DNA 体积是 2  $\mu$ L，在其他条件相同的情况下，我们的相对检测灵敏度将是 Sigma 公司该款试剂盒的 10 倍。