

《探针法支原体检测试剂盒》(含内参)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

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) 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), 用于对样品的支原体基因组 DNA 进行荧光定量 PCR 扩增检测。

试剂盒内同时含有内参对照质粒 mycoIC2 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。

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; (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, 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、最高的检测正确率、含内参对照从而可以区分真阴性样品和假阴性样品等一系列优点, 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》。

《探针法支原体检测试剂盒》主要缺点: 方法本身没有明显缺点, 配套仪器相对昂贵。

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) *A. laidlawii*, (9) *M. agalactiae*, (10) *M. bovis*, (11) *M. bovoculi*, (12) *A. axanthum*, (13) *M. buccale*, (14) *M. pneumoniae*, (15) *M. arthritidis*, (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, 然后告诉你本试剂是否可以识别。

《探针法支原体检测试剂盒》检测灵敏度: 经测试, 在每个反应管的 DNA 加入量为 2 μ L 的情况下, 本试剂盒的最高检测灵敏度 (即检测下限) 大约在 4-16 copies, 即 2-8 copies/ μ L。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) 探针法溶液 1P: 550 μ L (50 次), 含支原体和内参检测用引物及荧光探针;
- (2) 探针法溶液 2T: 50 μ L (50 次), 酶溶液;
- (3) 内参质粒 mycoIC2: 500 μ L;
- (4) 去离子水: 1.2 mL;
- (5) 阳性支原体 DNA: 50 μ L。

- 注 1: 本试剂盒由于含有内参质粒 mycoIC2 (用于监控支原体 DNA 提取和 qPCR 扩增的有效性), 客户可以选择进行样品支原体 DNA 的提取 (内参质粒 mycoIC2 在支原体 DNA 提取过程中加入), 也可以选择进行样品支原体 DNA 的提取 (内参质粒 mycoIC2 直接加入样品中)。
- 注 2: 客户如果选择进行样品支原体 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)。该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全兼容【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 μ L 变为 20 μ L 时) 有可能会影响到核酸的 PCR 扩增效率。
- 注 3: 本试剂盒的配套仪器可以是任何具有 FAM 和 VIC 检测通道的荧光定量 PCR 仪。需自备的试剂和耗材: 荧光定量 PCR 八联管、一次性手套、无 DNAase 的吸头、无 DNAase 的离心管。

检测过程

1. 待测样品的前处理

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: 对样品进行支原体 DNA 的提取:

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, 如果样品不进行前处理而直接检测, 有可能导致 qPCR 扩增失败 (qPCR 结果: 支原体通道和内参对照通道均无扩增曲线)。该类样品建议客户进行样品 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)。

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。

方法二: 样品不经 DNA 提取 (推荐。该方法不仅可以浓缩支原体从而提高相对检测灵敏度, 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), 具体方法如下:

(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) 往 50 μL 重悬后的样品中加入 4 μL 内参质粒 mycoIC2【内参质粒融化后, 请混匀后再吸取】。

(4) 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 (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 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 不得放于室温或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存一个月, 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 而后一起检测。

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】:

将探针法溶液 1P、阳性支原体 DNA、去离子水从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出, 放室温融化 (也可以用手握住帮助融化)。探针法溶液 1P 和探针法溶液 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 不能在室温长久放置 (可以短时间放置 5-10 分钟), 建议在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱直接吸取。

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), qPCR 反应体系分为样品经 DNA 提取和不经 DNA 提取两个不同反应体系, 具体如下:

2.1 样品经《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》进行 DNA 提取后的反应体系 (注意: 在 DNA 提取过程中, 必须按说明书加入内参质粒 mycoIC2):

(1) 反应体系:

表 1. 样品经 DNA 提取后的反应体系

	单个样品体积(μL)	样品总数	总体积(μL)
探针法溶液 1P	11	N	11 $\times$ N $\times$ 1.1
探针法溶液 2T	1	N	1 $\times$ N $\times$ 1.1

- 注: 总体积中多配制 10% (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 11 $\times$ 10 $\times$ 1.1=121 μL , 探针法溶液 2T 的总体积为 1 $\times$ 10 $\times$ 1.1=11 μL 。

- (2) 将上述 2 种溶液混合, 吹打均匀后, 按每管 12 μL 分装到荧光定量 PCR 八联管中。
- (3) 待测样品管加入 18 μL 提取好的待测样品 DNA (样品 DNA 加入量不能减少, 否则内参质粒扩增可能失败); 阴性对照管加入 2 μL 内参质粒 mycoIC2 (吹吸均匀后加入) 和 16 μL 去离子水 (为防止去离子水被污染, 此处建议使用 20 μL 移液枪配合 200 μL 吸头进行吸取操作); 阳性对照管加入 2 μL 阳性支原体 DNA 和 16 μL 去离子水。每管反应液的总体积为 30 μL 。
- 注: 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。

2.2 样品不经 DNA 提取的反应体系:

(1) 反应体系:

表 2. 样品不经 DNA 提取的反应体系

	单个样品体积(μL)	样品总数	总体积(μL)
去离子水	16	N	$16 \times N \times 1.06$
探针法溶液 1P	11	N	$11 \times N \times 1.06$
探针法溶液 2T	1	N	$1 \times N \times 1.06$

- 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。去离子水的总体积为 $16 \times 10 \times 1.06 = 169.6 \mu\text{L}$ 探针法溶液 1P 的总体积为 $11 \times 10 \times 1.06 = 116.6 \mu\text{L}$, 探针法溶液 2T 的总体积为 $1 \times 10 \times 1.06 = 10.6 \mu\text{L}$ 。
- (2) 将上述 3 种溶液混合, 吹打均匀后, 按每管 28 μL 分装到荧光定量 PCR 八联管中。
- (3) 待测样品管加入 2 μL 未提取的待测样品 DNA, 阴性对照管加入 2 μL 内参质粒 mycoIC2 (吹吸均匀后加入), 阳性对照管加入 2 μL 阳性支原体 DNA。每管反应液的总体积为 30 μL 。
- 注: 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。

2.3 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, 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:

表 3. 荧光定量 PCR 扩增程序

步骤	作用	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	预变性	1 cycle	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	否
2	预扩增 (不收集荧光)	5 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	否
			60 $^{\circ}\text{C}$	35 sec	否
3	正式扩增 (需要收集荧光)	40 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	否
			60 $^{\circ}\text{C}$	35 sec	是

- 注: 支原体检测荧光通道选择 FAM (Reporter: FAM, Quencher: None); 内参对照检测荧光通道选择 VIC (Reporter: VIC, Quencher: None); 反应体积 (Sample Volume) 为 30 μL ; 参考荧光 (Passive Reference, 只有 ABI 仪器需要设置) 选择 None。

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 (注: 其他荧光定量 PCR 仪的设置大同小异, 请参考各自仪器说明书进行设置):

(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 2 (将刚开始荧光值不稳定的几个循环排除在基线之外。如果起点 2 不合适, 可以适当增减), 终点为 10 左右。

(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:

FAM 通道 (检测支原体): 阳性对照管 FAM 通道有典型的 S 型扩增曲线 (即指数扩增) 且 Ct 值 ≤ 35 , 同时阴性对照管 FAM 通道的扩增线呈直线且无 Ct 值。

VIC 通道 (检测内参质粒): 阳性对照管由于不含有内参质粒, 其 VIC 通道的扩增线呈直线 (即使偶尔由于内参质粒的污染, 导致阳性对照管 VIC 通道有 S 型扩增曲线, 也不影响实验结果的判断)。阴性对照管其 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。

典型的阴性直线型扩增线和阳性 S 型扩增曲线如图 1 所示:

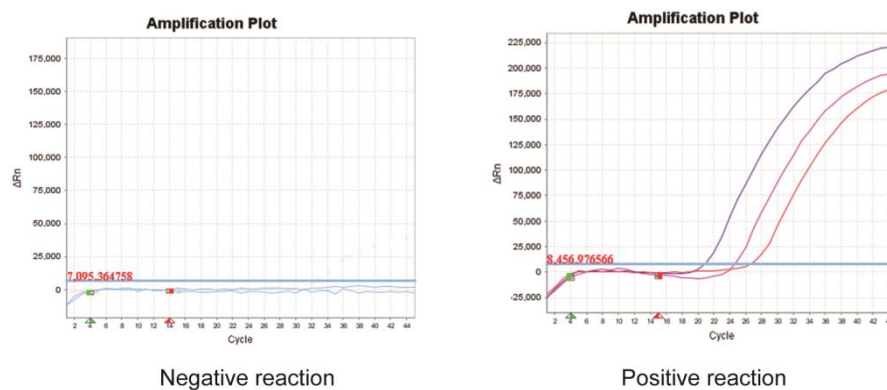


图 1. 典型的阴性直线型扩增线 (左) 和阳性 S 型扩增曲线 (右)

4.3 待测样品结果判断:

待测样品有可能出现以下 4 种组合:

表 4. 待测样品管 FAM 通道和 VIC 通道可能组合

组合	FAM 通道 (测支原体)	VIC 通道 (测内参)	支原体污染判断
1	S 型曲线	S 型曲线	支原体污染
2	S 型曲线	直线	支原体污染
3	直线	S 型曲线	无支原体
4	直线	直线	PCR 被抑制, 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。因为外加的内参质粒 mycoIC2 分子数极少, 如果支原体含量很大时, 内参质粒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, 外加的内参质粒 mycoIC2 分子数极少, 作为内参对照的 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℃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)。此外,二者相同的可能原因有(此种情况发生概率很低,一般不需要考虑):内参质粒 mycoIC2 在运输和储存中有部分降解,导致回收或者加入的内参质粒 mycoIC2 分子偏少,导致内参 VIC 通道扩增失败(解决方法:将内参质粒 mycoIC2 的加入量增加到原来的 2-4 倍)。

- 注 1: 阳性结果需要结合扩增曲线(主要)和 Ct 值(次要)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。

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(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。

3. 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。

4. 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 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. 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。
6. **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) 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。(3) 如果样品是未经提取的, 可以通过增加反应管中样品 DNA 的加入量, 比如由原来的 2 μL 增加到 18 μL , 如此可以提高检测灵敏度 9 倍【注意: (A) 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; (B) 如果确定要增加每个反应管中样品 DNA 的加入量, 样品中内参质粒的加入量要成比例减少。比如原来样品 DNA 的加入量为 2 μL , 则 50 μL 样品中需要加入 4 μL 内参质粒; 如果改变后样品 DNA 的加入量为 16 μL (原来 8 倍), 则 50 μL 样品中只需加入 0.5 μL 内参质粒 (原来 1/8), 以保持每个反应管中内参质粒的总加入分子数不变】。
7. 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。
8. 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。