

产品介绍

Quick Cell探针法支原体检测试剂盒（Quick Cell 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：体外细胞培养的上清、血清、各种体液（如唾液、尿液、鼻腔分泌物）、别的液体样品。

经多次测试，本试剂盒有记录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（M.为Mycoplasma的缩写；A.为Acholeplasma的缩写）。

订购信息

产品名称	货号	规格
Quick Cell 探针法支原体检测试剂盒	AC16L068	50T

产品组分

组分	规格
A. 探针法溶液 1P（50T）	550 μL，含支原体和内参检测用引物及荧光探针
B. 探针法溶液 2T（50T）	50 μL，酶溶液
C. 内参质粒 mycoIC2	500 μL
D. 去离子水	1.2 mL
E. 阳性支原体 DNA	50 μL

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），也可以选择不进行样品支原体DNA的提取（内参质粒mycoIC2在配制体系时加入）。

②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。

运输与保存

蓝冰运输。-20℃避光保存，有效期 60 个月。

使用方法

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 2-3d 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 2-3d 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：

1.1 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）。该类样品建议先进行样品 DNA 提取（或者离心清洗，见下文方法一）后再进行检测。提取 DNA 的过程有两个作用：

推荐此方法。该方法不仅可以从细胞裂解液中提高相对检测灵敏度，还可以有效避免部分可能的抑制物，PCR 扩增被抑制的可能性极低。如果该简单一步离心清洗的方法仍然无法去除抑制物，可以使用后文注意事项部分的三步离心清洗的方法。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 min，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 10 min，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 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8（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（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) 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 min（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 sec）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 2d 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。

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。

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、内参质粒 mycolC2 从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出，放室温融化（也可以用手握帮助融化）。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 1min）。探针法溶液 2T 不能在室温长久放置（可以短时间放置 5-10min），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），待测样品的前处理方法不同，对应的反应体系也不同，具体如下：

2.1 样品进行 DNA 提取后的反应体系

在 DNA 提取过程中，必须按说明书加入内参质粒 mycolC2。如果提取时没有加入内参质粒 mycolC2，则按照后文“样品不经 DNA 提取的反应体系”进行操作：

(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	$11 \times N \times 1.06$
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。

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 $11 \times 10 \times 1.06 = 116.6 \mu\text{L}$ ，探针法溶液 2T 的总体积为 $1 \times 10 \times 1.06 = 10.6 \mu\text{L}$ 。

处理液使用 20 μL 移液枪吸取 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（吹吸均匀后加入）和 16 μL 去离子水。每管反应液的总体积为 30 μL 。

2.2 样品不经 DNA 提取的反应体系：

(1) 反应体系：

表 3. 内参质粒 mycolC2 统一在配制 PCR 反应体系时加入

	单个样品体积(μL)	样品总数	总体积(μL)
去离子水	14	N	$14 \times N \times 1.06$
探针法溶液 1P	11	N	$11 \times N \times 1.06$
探针法溶液 2T	1	N	$1 \times N \times 1.06$
内参质粒 mycolC2	2	N	$2 \times N \times 1.06$

注：总体积中多配制 6%（该比例如果觉得不合适，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。

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 $14 \times 10 \times 1.06 = 148.4 \mu\text{L}$ ，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 $1 \times 10 \times 1.06 = 10.6 \mu\text{L}$ ，内参质粒 mycolC2 的总体积为 $2 \times 10 \times 1.06 = 21.2 \mu\text{L}$ 。

(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 待测样品 DNA，阴性对照管加入 2 μL 去离子水，阳性对照管加入 2 μL 阳性支原体 DNA（吹吸均匀后加入）。每管反应液的总体积为 30 μL 。

(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，应该佩戴全新的 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 $^{\circ}\text{C}$	2 min	否 (No)
2	预扩增 (不收集荧光)	5 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	否 (No)
			60 $^{\circ}\text{C}$	35 sec	否 (No)
3	正式扩增 (需要收集荧光)	40 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	否 (No)
			60 $^{\circ}\text{C}$	35 sec	是 (Yes)

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

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某个样品，点击仪器勾选的自动 Threshold 线，将其选为 ☒ Auto，改为 ☐ Auto，然后手动调整阈

阳性对照管，其 FAM 通道应扩增出直线，其 VIC 通道应扩增出 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：

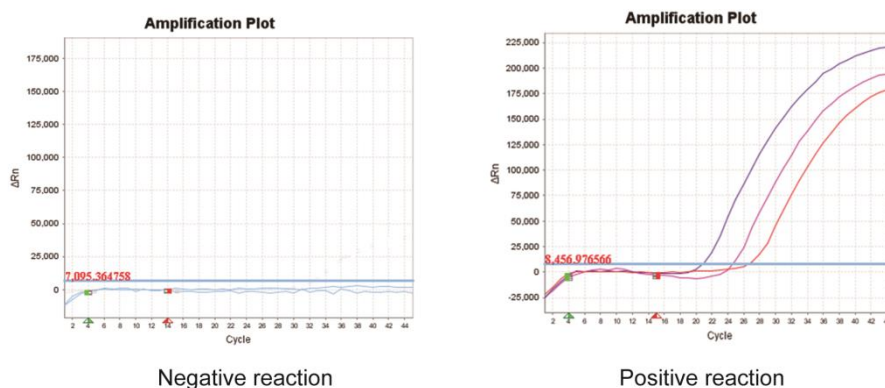


图 1. 典型的阴性直线型扩增线（左）和阳性 S 型扩增曲线（右）

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 mycolC2 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）（由于提取过程中，外加的内参质粒 mycolC2 分子数较少，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 15min）。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（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:无论 FAM 通道，还是 VIC 通道，只要其扩增曲线有明显抬升（呈现 S 型曲线趋势），即使其 Ct 值在 35-40 范围内，该检测结果仍可判断为阳性，可以报告该 Ct 值。

注 3: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. 本产品主要用于细胞上清支原体污染检测，仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 如发现细胞被支原体污染，推荐使用李记生物的 Quick Cell 支原体祛除预防试剂盒（货号：AC16L066）、EZ 水