



## Quick Cell 探针法支原体检测试剂盒

### 产品描述

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 $\mu$ L, 含支原体内参检测用引物及荧光探针
B. 探针法溶液 2T (50T)	50 $\mu$ L, 酶溶液
C. 内参质粒 mycoIC2	500 $\mu$ L
D. 去离子水	1.2 mL
E. 阳性支原体 DNA	50 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C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)。该类样品建议客户进行样品 DNA 提取 (或者离心清洗，见后文方法二) 后，再进行检测。提取 DNA 的过程有两个作用：(1) 基本可以去除所有抑制 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。

## 1.2 方法二: 样品不经 DNA 提取

推荐此方法。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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  液体), 用 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 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( $\mu\text{L}$ )	样品总数	总体积( $\mu\text{L}$ )
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  $1 \times 10 \times 1.06 = 10.6 \mu\text{L}$ 。

- (2) 将上述 2 种溶液混合, 吹打均匀后, 按每管 12  $\mu\text{L}$  分装到荧光定量 PCR 八联管中。



(3) 待测样品管加入 18  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  内参质粒 mycolC2 (吹吸均匀后加入) 和 16  $\mu\text{L}$  去离子水 (为防止去离子水被污染, 此处建议使用 20  $\mu\text{L}$  移液枪配合 200  $\mu\text{L}$  吸头进行吸取操作); 阳性对照管加入 2  $\mu\text{L}$  阳性支原体 DNA (吹吸均匀后加入) 和 16  $\mu\text{L}$  去离子水。每管反应液的总体积为 30  $\mu\text{L}$ 。

## 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( $\mu\text{L}$ )	样品总数	总体积( $\mu\text{L}$ )
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  $\mu\text{L}$  分装到荧光定量 PCR 八联管中。

(3) 待测样品管加入 2  $\mu\text{L}$  待测样品 DNA, 阴性对照管加入 2  $\mu\text{L}$  去离子水, 阳性对照管加入 2  $\mu\text{L}$  阳性支原体 DNA (吹吸均匀后加入)。每管反应液的总体积为 30  $\mu\text{L}$ 。

(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  $\mu\text{L}$ ; 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:

阳性对照管: 其 FAM 通道有典型的 S 型扩增曲线 (即指数扩增), 其 VIC 通道的扩增线呈直线或者 S 型曲线。  
 阴性对照管: 其 FAM 通道的扩增线呈直线, 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:

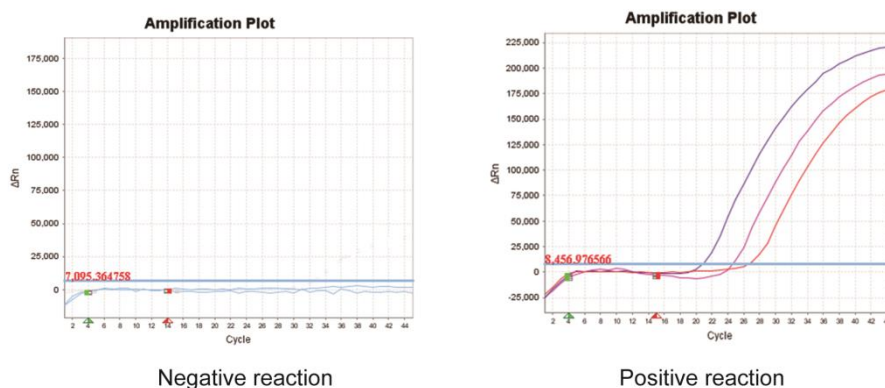


图 1. 典型的阴性直线型扩增线 (左) 和阳性 S 型扩增曲线 (右)

## 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 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°C 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 水浴锅抑菌剂 (货号: AC16L162)、EZ 细胞房除菌剂 (货号: AC16L143)。产品详情可咨询销售人员或见官网: [life-ilab.com](http://life-ilab.com)