

Mycoplasma qPCR Detection Kit (probe method)

qPCR 法支原体检测试剂盒 (探针法)

产品内容

产品组成	MA0350-1 20T	MA0350-2 100T
Probe qPCR Mix	200 µl	1 ml
Primer & Probe Mix	40 µl	200 µl
Internal Control Template (IC)	20 µl	100 µl
Positive Control Template (PC)	40 µl	200 µl
Nuclease-free Water	200 µl	1 ml
说明书	1 份	1 份

产品简介

支原体在自然界分布广泛，无细胞壁，直径为 0.1-0.3µm，且形态易变，极易通过除菌过滤器，通常附着在细胞膜上生长，普通细胞培养用抗生素对其无效。支原体污染发生后，细胞外形可能没有明显的变化，细胞也不会死亡，培养基一般不发生浑浊，严重污染时表现为细胞生长速度变慢，状态变差，细胞形态改变，改变细胞新陈代谢，抑制细胞生长，导致染色体畸变，细胞膜抗原性改变，细胞复苏后存活率降低等。在细胞培养过程中如果在显微镜下发现破碎的细胞很多，培养基 pH 变化明显，需要频繁更换新鲜培养基才能维持传代培养的时候，即应怀疑支原体污染。

细胞污染常见的支原体种类有：口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、发酵支原体 (*M. fermentans*)、人型支原体 (*M. hominis*)、唾液支原体 (*M. salivarium*)、肺炎支原体 (*M. pulmonis*) 和梨支原体 (*M. pirum*) 等。支原体检测方法有：培养法、指示细胞 (DNA 染色) 法、NAT 核酸扩增 (PCR/qPCR) 法、ELISA 法及扫描电镜法等。

本试剂盒采用探针法 qPCR 高灵敏检测细胞培养等生物材料中 (如细胞培养物、实验动物分泌物、动物血清) 污染的支原体，包含抗体法热启动 Taq 酶、探针、引物、内部对照、阳性对照等 qPCR 所需所有组分。本试剂盒利用特异性引物与荧光探针 (一端标记荧光物质，另一端标记荧光淬灭物质) 结合，当探针处于完整状态时，由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光，但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后，淬灭抑制作用解除，荧光物质发出荧光。通过测定荧光强度，能够实时监控扩增产物量，可以大大提高支原体检测的特异性和灵敏度。

本试剂盒可直接检测含支原体的细胞培养基上清等样品，无须提取 DNA；仅 1 个小时即可完成支原体检测。引物和探针预混设计，方便操作；提供了阳性对照和内部对照，便于确定 qPCR 是否正常，防止假阴性的产生；使用抗体法热启动 Taq 酶，检测限度在 10CFU 以下；特异性引物设计，采用 qPCR 探针方法，人源、鼠源细胞，以及细菌、真菌均不会检出；抗干扰能力强，不同种类的培养基和添加物不会影响检测结果；兼容性好，至少可以检出 39 种细胞污染常见支原体。

使用方法

1. 样品准备: 取适量待检培养基上清于离心管中, 细胞悬液、动物分泌物和动物血清等可提取DNA后再进行检测。

【注】培养基上清应在培养细胞3-6天保持不换液的情况下收取。

2. qPCR体系配制:

(1) 充分融解并混匀试剂盒中的各种溶液, 实验过程中佩戴口罩和手套, 避免不当操作引起污染, 加样时在冰盒内操作。

(2) 按下表配制qPCR反应液(以20 μ l体系为例):

试剂	实验组	阳性对照	阴性对照
Probe qPCR Mix	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primer & Probe Mix	2 μ l	2 μ l	2 μ l
样品	1 μ l		
Internal Control Template (IC)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Positive Control Template (PC)		2 μ l	
Nuclease-free Water	6 μ l	5 μ l	7 μ l

【注】Internal Control Template (VIC标记) 为内对照DNA, 用于添加到每个PCR反应中, 检测是否有抑制PCR反应物质。Positive Control Template (FAM标记) 为阳性对照DNA, 可用于检测qPCR是否正常进行。如果确定没有抑制PCR反应的物质, 可以不添加IC。

【注】请最后加入Positive Control Template和Internal Control Template, 防止被污染。

(3) 加样结束后用移液器轻轻吹打混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底, 封板。将PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上, 开始PCR反应。

(4) 荧光检测通道的选择: Internal Control探针的荧光基团是VIC, 可选择检测通道为VIC/HEX/JOE, 支原体探针的荧光基团是FAM, 可选择检测通道为FAM。

3. 反应程序:

预变性	95°C	5min	} 40-45 cycles
变性	95°C	15s	
退火/延伸(荧光信号收集)	60°C	30s	

4. 结果判断:

(1) 反应结束后, 使用荧光定量PCR仪提供的软件分析数据, 并参考下表进行结果判断:

支原体探针 (FAM 通道)	内部对照探针 (VIC通道)	结果判断
典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 \leq 30	典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 \leq 30	阳性
无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值 $>$ 33	典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 \leq 30	阴性
典型 S 型扩增曲线且 30 \leq Ct 值 \leq 33	典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 \leq 30	疑似阳性
无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值 $>$ 33	无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值 $>$ 33	存在 qPCR 抑制

(2) 疑似阳性样品建议继续培养2-3天后重新取样后再次进行检测。

(3) 存在qPCR抑制现象的样品, 建议适当稀释, 或者进行DNA提取后作为模板再次检测。

保存条件

-20℃避光保存，自生产之日起12个月有效。其中Primer & Probe Mix需要避光保存，尽量避免反复冻融。

Positive Control Template和Internal Control Template长期不用时可置于-80℃冷冻保存。

注意事项

1. 所有试剂在使用前于冰上彻底解冻、混匀，混匀过程中尽量避免产生气泡，使用完毕后于-20℃保存。
2. 试剂中含有荧光染料，保存或进行PCR反应时尽量避光操作，以避免荧光淬灭问题。
3. 每次实验必须设置阴性对照、阳性对照，实验组建议设置样品模板梯度和复孔，至少以两个复孔重复结果为准，避免出现假阳性或假阴性。
4. qPCR反应板封膜或盖盖子时须反复压紧。为避免影响荧光信号读取，请注意不要在管盖或者膜上做标记，或者用刮板反复摩擦。
5. qPCR是超灵敏的检测方法，操作时必须佩戴口罩，严格按照qPCR操作标准，防止引入外源污染影响实验结果。
6. 为了确保细胞实验的可靠性及稳定性，建议定期进行支原体污染检测。
7. 如果检测出有支原体污染，需要清除或预防支原体，可以使用支原体预防或清除试剂（美仑货号：MA0339、MA0340）。
8. 建议使用带滤芯的吸头配制qPCR反应体系，防止污染导致假阳性。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。