

支原体检测试剂盒（荧光-PCR 法）说明书

【产品名称】

支原体检测试剂盒（荧光-PCR 法）

【包装规格】

50 反应/盒、100 反应/盒

【预期用途】

本试剂盒可用于定性或定量检测生物制品（如血液、蛋白 / 重组蛋白、抗体、细胞收获液或细胞培养上清等）或环境中是否存在潜在的支原体污染。

【检测原理】

本试剂盒基于 NAT(nucleic acid amplification techniques)方法，通过扩增支原体中高度保守的 16S rRNA 编码区来特异性检测支原体，而真核生物和其他种类的细菌则不能被扩增。试剂盒采用 FAM 荧光作为支原体检测荧光通道，配备浓度为 10^6 拷贝数/ μL 的阳性标准品 DNA 片段，可用于支原体的定性或定量检测，检测灵敏度为 10 拷贝数/ μL 。

本试剂盒反应体系能够大幅降低抑制物对 PCR 反应的影响，广泛适用于煮沸法、磁珠法、渗透压法、柱提取法等方法提取到的支原体核酸。操作时可通过将阳性标准品添加到待检测样品中作为内部质控品，检测 FAM 荧光信号并对比阳性标准品 Ct 值来评估 PCR 抑制物的影响，避免由于抑制物存在导致 PCR 灵敏度降低甚至核酸扩增失败出现的假阴性结果。

阳性标准品还可以添加到待提取样本中用于评估核酸提取效率。

本试剂盒严格按照 EP 2.6.7 进行专属性、检测限及耐用性验证。

【主要组成成分】

组分名称	规格及数量		储存条件
	50 反应/盒	100 反应/盒	
PCR Reaction Mix	500 μL × 1 管	500 μL × 2 管	首次使用前 -20°C 开启后 2°C~4°C
MycProbe Assay	150 μL × 1 管	150 μL × 2 管	
Mycoplasma Positive Control (10^6 copies/ μL)	200 μL × 1 管	200 μL × 2 管	
PCR Grade Water	1 mL × 1 管	1 mL × 2 管	

【储存条件及有效期】

本试剂盒储存条件为-20°C，有效期 12 个月。

PCR Reaction Mix、MycProbe Assay 及阳性标准品 Mycoplasma Positive Control 在首次解冻使用后请于 2°C~4°C 摄氏度保存，并尽量避免反复冻融。

【适用仪器】

适用于多种 qPCR 热循环仪，包括但不限于：Applied Biosystems QuantStudio™ Real-Time PCR，BIO-RAD CFX Connection，QIAGEN QIAquant 96，Roche LightCycler 96 等。

【需要准备的耗材与设备】

本试剂盒提供必要的支原体检测试剂，其他常规的 qPCR 仪器与耗材需要用户自行准备，可能需要的实验耗材或设备有：

- 具备 FAM 荧光通道检测能力的 qPCR 热循环仪；
- 对于需要添加 ROX 染料作为参比的 qPCR 仪，ROX 需用户根据实际使用仪器自备；
- qPCR 反应管及 PCR 反应管管盖(或 PCR 反应板及 qPCR 封板膜)；
- 500 μ L、1.5 mL、2.0 mL 离心管；
- 移液枪以及带有滤芯的移液枪 tip 头(10 μ L，100 μ L，1000 μ L 规格)；
- 用于提取支原体核酸的提取试剂盒或无菌 PCR 级水。

【检验方法】

1、样本准备

由于支原体污染可能存在于多种不同类型的生物制品中，直接检测可能会对结果造成干扰。因此在进行 qPCR 检测前，需要对生物制品样本进行核酸提取前处理以尽可能多地排除样本中的基质干扰。

对于细胞培养过程的支原体污染检测，应在细胞培养密度达 80~90% 时开始收集细胞培养样本。细胞培养的上清液是最理想的检测支原体污染的材料。一般情况下，细胞上清不需要额外的样品前处理步骤便可直接使用本试剂盒来检测。但是不同种类的细胞培养基中的一些成分可能会对 PCR 反应产生抑制作用。因此，在使用本试剂盒检测细胞培养过程中支原体污染时，为了尽可能降低外部因素干扰，获得稳定可靠的检测结果，建议**先将支原体离心富集并提取核酸**，以去除细胞培养过程中潜在的未知抑制物干扰。在细胞培养过程中，支原体污染的平均值约为 1,000~6,000 CFU/mL，细胞上清中的支原体数量足以用于本试剂盒的成功检测。用户可使用以下方法来获取细胞培养上清中的支原体 DNA：

1.1 煮沸法样本核酸快速检测：

-
1. 将 500 μ L~1 mL 细胞培养上清液转移至 1.5 mL 离心管中，盖紧管盖；
-
2. 95°C 孵育 5~10 分钟；
-
3. 10,000 \times g 离心 30s，破碎的细胞位于离心管底部，DNA 位于上清液；
-
4. 取 3 μ L 上清液直接用于支原体 qPCR 检测，如不能立即检测，可将样本暂时置于 2~8°C 存放，或置于-20°C 以下长期保存。
-

1.2 煮沸法样本支原体富集核酸直接提取（推荐）：

-
1. 将 1 mL 细胞培养上清液转移至 1.5 mL 离心管中，盖紧管盖；
 2. 3,000×g 离心 10min，用移液枪小心收集上清液，置换到新的 1.5 mL 离心管，弃去底部细胞沉淀；
 3. 将收集的上清以 16,000×g 离心 30min，用移液枪吸弃上清液，保留底部支原体沉淀。注意此步骤移液枪枪头不要触碰到支原体沉淀位置；
 4. 使用 100 μL ddH₂O（自备）将支原体吹打混匀，获得富集的支原体悬液；
 5. 95°C 加热 10min，获得煮沸法 DNA 提取液；
 6. 取 18 μL DNA 提取液，加入 2 μL 阳性标准品（Mycoplasma Positive Control）作为内部质控；
 7. 取 3 μL DNA 提取液直接用于支原体样本的 qPCR 检测，如不能立即检测，可将样本暂置于 2~8°C 存放，或置于 -20°C 以下长期保存。
-

1.3 柱提法样本核酸提取（以 HiPure Bacterial DNA Kit 为例）：

-
1. 将 0.5~2 mL 细胞培养上清液转移至 2mL 离心管中，盖紧管盖；
 2. 10,000×g 离心 1 分钟，弃上清液，获得富集在离心管底部的支原体；
 3. 加入 220 μL Buffer STE Plus, 30 μL lysozyme 和 10 μL RNase A 至沉淀中。涡旋充分悬浮，室温静置 10~20 分钟；
 4. 加入 250 μL Buffer DL 和 10 μL Proteinase K 至重悬液中。涡旋混匀，70°C 水浴消化 10 分钟；
 5. 加入 250 μL 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 15 秒；
 6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2 mL 收集管中。把第 5 步获得的混合液（包括沉淀）转移至柱子中。10,000×g 离心 1 分钟；
 7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μL Buffer GW1 至柱子上。10,000×g 离心 1 分钟；
 8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μL Buffer GW2 至柱子中。10,000×g 离心 1 分钟；
 9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000×g 离心 2 分钟；
 10. 将柱子装在新的 1.5 mL 离心管中。加入 30~100 μL 预热至 70°C Buffer AE 至柱子膜中央。放置 3 分钟。10,000×g 离心 1 分钟；
 11. 丢弃 DNA 结合柱，流出液可暂置于 2~8°C 存放，或置于 -20°C 以下长期保存。
-

细胞培养上清液或其他类型样本也可采取磁珠法或渗透压法来对支原体 DNA 进行富集提取，具体操作步骤可参考相关核酸提取试剂说明。

2、内部质控

内部质控用于评估 qPCR 扩增过程中抑制物对检测结果的干扰。qPCR 的抑制物可能会使扩增效率降低、Ct 值延后导致灵敏度下降甚至出现扩增失败导致假阴性结果。因此通过内部质控，可以有效区分出阴性和假阴性结果（具体评估见[抑制性评估](#)）。本试剂盒的内部质控原理是通过将确定拷贝数的支原体 DNA 加入到待检测样本的核酸提取溶液中，通过扩增内部质控中的标准品 DNA 序列并检测 FAM 信号，评估检测样本溶液中的潜在抑制物对结果的干扰。此外，标准品 DNA 也可以添加到未提取核酸的或富集后的原始样本中用以评估核酸提取效果。每一个独立的检测样本在测试支原体污染时均需要设置与之对应的内部质控。

内部质控样本制备：

直接将 Mycoplasma Positive Control (10^6 copies/ μ L) 阳性标准品按照 1:10 的比例加入到获得的核酸提取液中（例：在 18 μ L 支原体核酸提取液中加入 2 μ L Mycoplasma Positive Control）混匀，以获得 qPCR 上机样本对应的内部质控。

如果需要评估核酸提取效果，则需要在离心富集后的支原体中按照最终提取体积的 10% 加入阳性标准品。例如，最终计划提取到 100 μ L 核酸提取液，需要在富集支原体去除上清后，加入 10 μ L 阳性标准品后进行提取。

3、阳性质控

通过将 Mycoplasma Positive Control (10^6 copies/ μ L) 与水按照 1: 10 的比例稀释配置，以获得阳性质控（ 10^5 copies/ μ L），例：在 18 μ L PCR 级水中加入 2 μ L 的阳性标准品。

4、反应体系配置

待测样本组应当与内部质控组、阳性对照组和阴性对照组一起进行检测，建议每组至少设置两个复孔。反应体系配置完成后可以直接上机检测，或放置于-20℃以下保存，不可以反复冻融以及冻干保存。所有试剂在使用前应当充分解冻并摇晃均匀。总反应体系为 20 μ L，反应体系内容参见下表：

体系配置：

试剂组分	反应数×1	反应数×4	反应数×n
PCR Reaction Mix	10 μ L	50 μ L	10×(n+1) μ L
MycProbe Assay	3 μ L	15 μ L	3×(n+1) μ L
总计	13 μ L	65 μ L	13×(n+1) μ L

将上述混合液混匀后按下表给样本和每个组加入 DNA 模板：

样本分组	每孔反应体系加入量			
组分名称	阴性对照	阳性对照	未知样本	内部质控
混合液	13 μ L	13 μ L	13 μ L	13 μ L
PCR 级水	7 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
阳性质控 (10 倍稀释的阳性标准品)	--	3 μ L	--	--
待测样本核酸提取液	--	--	3 μ L	--
待测样本内部质控	--	--	--	3 μ L

5、荧光 PCR (qPCR) 反应参数

qPCR 反应参数适用于包括但不限于 ABI QuantStudio 系列、BioRad CFX 系列、QIAquant 系列等在内的 qPCR 仪器。标准 PCR 反应时间约为 1.5 小时。

注意：对于需添加 ROX 参比染料的仪器，请按照仪器使用说明自行准备 ROX 参比染料，并按照仪器要求添加 ROX 染料于 qPCR 反应体系中，对于不需要添加 ROX 参比染料的仪器，则可忽略本条事项。

qPCR 反应参数设置：

反应步骤	反应阶段	温度	时间	循环数
1	预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	--
2	变性	95 $^{\circ}$ C	15 sec	40
3	退火/延伸 (读取 FAM 荧光)	60 $^{\circ}$ C	45 sec	

注：反应体系：20 μ L

【数据处理及结果判定】

检测成功的前提是内部质控需要出现扩增。由于内部质控和样本是独立两管反应体系，因此不存在双荧光内部质控反应体系中的内部质控 DNA 和目标 DNA 的竞争作用。通过设置标准曲线并计算内部质控中添加的标准品 DNA 最终浓度，可以分析内部质控 Ct 值的变化(delta Ct)情况来评估抑制物对结果的影响。

1、抑制性评估

由于内部质控和阳性质控样本中标准品的浓度相同，抑制性评估将内部质控与阳性质控的检测结果对照查看。评估方式如下，评估时应考虑操作人员和仪器产生的 Ct 值误差。

Δ Ct (Ct _{内部质控} -Ct _{阳性质控})	Ct _{待测样本}	检测有效性	说明
Δ Ct > 3.5	阳性	有效	存在较大抑制性，但未对检测结果造成影响。

	阴性	无效	存在较大抑制性，影响检测准确性。如果样本中含有低浓度的支原体，将造成假阴性结果
1.5 < ΔCt ≤ 3.5	阳性	有效	存在较小抑制性，但未对检测结果造成影响。
	阴性	无效	存在较小抑制性，该抑制效果可能影响最低检测限准确性，并可能对含有最低检测限浓度的支原体 DNA 样本造成假阴性结果
0 < ΔCt ≤ 1.5	阳性	有效	存在轻微抑制，该抑制效果不影响最低检测限准确性。
	阴性		
ΔCt < 0	阳性	有效	不存在抑制性，但样本基质中可能含有增强 PCR 反应效果的物质，该增强效果不影响最低检测限准确性。
	阴性		

2、结果判定

检测样本在 FAM 通道中出现扩增荧光信号表明了支原体的存在。定量分析是基于阈值周期(Ct)值和阳性品标准曲线来确定的。对于不同的仪器，由于仪器加热模块加热效率存在差异，扫描荧光位置和扫描荧光方式以及配套软件计算阈值和 Ct 的方式不同(如归一化/delta Rn 等)，因此不同设备之间 Ct 值可能存在差异，如 Ct 值整体前移或后移、delta Ct 值存在差异等。因此在进行数据分析时，建议使用相应的 qPCR 仪器测定一次标准曲线。并建议以最大荧光值的 10% 为阈值基线来对 Ct 值进行定性判断。

对于 qPCR 反应参数获得的检测结果：

Ct < 38 为 PCR 阳性；Ct ≥ 38 的 PCR 反应为阴性。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外使用。且只能由经过培训的实验室工作人员使用。**所有样本都应被认为具有潜在传染性，并以应有的小心和注意处理。**一定要穿合适的实验服和一次性手套。本试剂盒不含有害和传染性物质。残余物可根据当地法规进行丢弃。
2. 所提供的试剂不应与不同批次的试剂混合使用，而应作为一个整体使用。试剂盒中的试剂不得超过其保质期使用。

3. PCR 抑制可能是由样品基质引起的，或者在提取 DNA 的情况下，由洗脱缓冲液引起的。因此，需要内部质控进行抑制性评估。
4. 需要定期在检测中增加阳性对照和阴性对照，以保证结果的准确性。每次 PCR 需要包括至少一个无模板对照(NTC 或阴性对照)，建议使用 PCR 级水作为无模板或阴性对照。
5. 建议在准备和测试过阴性对照后再准备阳性对照，从而避免加样过程中存在遗留污染和交叉污染。同时建议全程使用有防止气溶胶污染功能的带滤芯枪头。
6. 为了尽量减少反复冻融次数，建议将试剂分装并保存在-20℃。
7. 质控样本必须以与测试样本相同的处理方式处理。

【生产商信息】

注册人 / 生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务电话：4000-192-196

生产地址：北京市昌平区中关村科技园白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及 6 层 601

【说明书版本及核准日期】

V2.0 2024.10.23