

# M5 PCR Mycoplasma Detection Kit (V.2)

## 通用型 PCR 法支原体检测试剂盒（版本 2）

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 PCR Mycoplasma Detection Kit	20T	MF439-T
M5 PCR Mycoplasma Detection Kit	100T	MF439-01

**【储存条件】** -20℃保存。

#### 【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](http://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。目前，细胞培养液中支原体污染的检测通常使用的是 PCR 法。但是 PCR 法也有明显的缺点：（1）整个过程大约需要 3 个小时；（2）由于细胞培养数天后，培养液中经常含有严重抑制 PCR 扩增的代谢物，所以样品的前处理一般是 PCR 法不可或缺的环节；（3）PCR 法的灵敏度有限，通常需要将培养液离心浓缩或者抽提 DNA 后再检测；（4）PCR 产物的电泳，需要用到 EB 等潜在的致癌物质；（5）需要用到 PCR 仪、电泳槽、凝胶成像仪、离心机等仪器。

本公司已经开发出了专用于体外细胞培养的《一步法恒温支原体检测试剂盒》，与 PCR 法支原体检测相比，其具有许多优点：耗时短、灵敏度高、操作简单、不会被细胞代谢产物抑制、结果无需电泳肉眼可直接判断等。尽管如此，《一步法恒温支原体检测试剂盒》可能也有个小缺点：因为《一步法恒温支原体检测试剂盒》需要至少同时使用 4 条引物才能完成扩增，其引物设计相对困难。虽然经我们测试，该试剂盒至少可认识其说明书中列举的 13 种支原体，而这 13 种支原体大约占污染细胞的支原体种类的 99% 左右。但是，不排除《一步法恒温支原体检测试剂盒》无法识别个别在体外细胞培养中出现概率极低的支原体。为此，我们特意开发了具有广谱识别能力的《PCR 法支原体检测试剂盒》作为补充。

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》和《发光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，检测的正确率应该在 99.9% 以上。如果同时使用这三种试剂盒进行检测，检测的正确率应该在 99.99% 以上。如果将所有待测样品统一接种到支原体液体培养基，然后在 37℃ 培养箱中培养 3 天后，再用本公司三种支原体检测试剂盒同时进行检测，则基本可以确保您的检测结果 100% 正确。通过将待测样品接种到支原体液体培养基培养 3 天的目的是：防止一些支原体含量极其微量的待测样品（比如：细胞培养用的血清、胰酶、抗生素、培养液和极个别的细胞培养上清），如果不经过大量繁殖，有可能漏检。

**【产品用途】** 检测可能含支原体的样品，比如：体外细胞培养的上清；血清；唾液、尿液、鼻腔分泌物等液体样本；

#### 【产品组成】

	20T	100T
(1) 支原体引物和内参（100 次）：	40μL	206 μL
(2) 阳性支原体 DNA：	10 μL	50 μL
(3) 去离子水：	0.36ml	1.8 mL（请使用普通蒸馏水或去离子水，不能使用去内毒素的水）。

- 注意 1：以下试剂需要自己准备：（1）Taq DNA 聚合酶和 2.5 mM 的 dNTP【推荐使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version（首选。货号：RR006A，可用 400 次，大约 1 元/次）或者 Ex Taq 酶（货号：RR001A，可用 400 次，大约 0.6 元/次），二者均包含 2.5 mM 的 dNTP。】；（2）6× DNA 上样缓冲液【聚合美 MF144】。

- 注意 2: 本试剂盒不能使用 Takara 公司的普通 Taq 酶 (货号: R001A), 使用该酶的结果非常不稳定, 灵敏度也较差。

## 【操作步骤】

### 1、待测样品的准备

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:直接检测(该方法无法去除可能的抑制物,PCR 扩增被抑制的可能性较大):

(1)取 150  $\mu$ 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 minutes,取离心后的上清 100  $\mu$ L 用于支原体检测,丢弃下层剩余的 50  $\mu$ L (含细胞沉淀)。

(2)已经离心去除细胞的待测样品可以直接检测,也可以进行热处理后再检测(热处理后,样品保存更稳定),具体如下:95  $^{\circ}$ 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。

方法二:简单离心清洗(推荐方法。该方法不仅可以浓缩支原体从而提高检测的相对灵敏度,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):

(1)根据浓缩倍数,可以取 100 - 1500  $\mu$ 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 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(勿碰到沉淀!),用 20-50  $\mu$ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8 (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  $\mu$ L 的样品而最后用 20  $\mu$ L 重悬,则支原体浓度大约提高了 75 倍,相对灵敏度也提高了 75 倍】。

(3)该重悬后的样品可以直接检测,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  $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冰箱保存,不得放于室温或 4 $^{\circ}$ C冰箱。样品在-20 $^{\circ}$ C至少可以保存一个月,在-80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冰箱保存,而后一起检测。
- 注 4: 如果预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、个别细胞培养上清等),可以采取提高检测的灵敏度,具体方法请看后文注意事项部分:如果提高本试剂盒检测灵敏度。

2、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】:

2.1 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),请按下表(表 1)进行 PCR 体系(总体积 25  $\mu$ L)的配制:

表 1. PCR 扩增体系的配制（以使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version 为例举例说明）

	单个样品体积 (μL)	样品总数	总体积 (μL)
去离子水	16.375	N	16.375×N×1.06
Takara 10× Ex Taq buffer(含 Mg <sup>2+</sup> )	2.5	N	2.5×N×1.06
2.5 mM dNTP	2	N	2×N×1.06
Takara 5 Units/μL Ex Taq Hot Start	0.125	N	0.125×N×1.06
支原体引物和内参	2	N	2×N×1.06

- 举例：1) 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 16.375×10×1.06=173.575 μL；Takara 10× Ex Taq buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)的总体积为 2.5×10×1.06=26.5 μL；2.5 mM dNTP 的总体积为 2×10×1.06=21.2 μL；Takara 5 Units/μL Ex Taq Hot Start 的总体积为 0.125×10×1.06=1.325 μL；支原体引物和内参的总体积为 2×10×1.06=21.2 μL。将上述几种溶液混合均匀即可。
- 注意 1: 总体积中多配制 6%（客户如果觉得该比例不合适，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。
- 注意 2: 如果有条件，PCR 体系的配制最好在冰上进行操作。
- 注意 3: 本试剂盒不推荐使用 2×的 PCR mixture（内含 Taq 酶、缓冲液和 dNTP），建议使用 Taq 酶、10×Taq 缓冲液和 dNTP 等试剂自己配置 PCR 体系。如果使用 2x 的 PCR mixture，那么 PCR 的反应体系（25 μL）应该按照如下进行配置：2×的 PCR mixture（12.5 μL）、支原体引物和内参的体积（2 μL）、阳性支原体 DNA 或待测样品的体积（2 μL），然后用去离子水补足到总体积 25 μL。
- 注意 4: PCR 的反应体积（25 μL）、支原体引物和内参的体积（2 μL）、阳性支原体 DNA 或待测样品的体积（2 μL），这是经过优化后的最佳体积，不能随意改变，否则检测结果容易不稳定。
- 注意 5: 为了避免可能的污染，收到的支原体引物和内参，可以适当分装（比如：每支 40 μL，分装到 0.5 mL 的离心管中）后冷冻保存。
- 注意 6: 如果使用的是其他 Taq 酶（前提是：阴性对照的 586 bp 内参条带必须有一定亮度，且稳定性良好，否则不能使用），酶的加入量需要根据其说明书进行调整，去离子水的加入量也要相应调整。

2.2 将上述配制好的 PCR 反应体系，吹打均匀后，按每管 23 μL 分装到 0.2 mL 的 PCR 管中。

2.3 待测样品管加入 2 μL 待测样品，阴性对照管加入 2 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。每管反应液的总体积为 25 μL。

- 注：1) 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。2) 进行反应体系配制的房间，与样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间最好分开。

### 3、PCR 设置参数

1 cycle      94 °C for 2 minutes  
 40 cycles    94 °C for 15 seconds  
                  55 °C for 15 seconds  
                  72 °C for 45 seconds  
 1 cycle      72 °C for 5 minutes  
 1 cycle      8 °C forever

- 注意：PCR 参数请不要更改，否则可能导致内参或阳性条带扩增失败。

### 4、PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

- (1) 配制含核酸染料 (MF079-plus) 的浓度为 1.5% 的 DNA 琼脂糖凝胶【注：琼脂糖凝胶的最佳浓度为 1.5%，此浓度下，条带分离效果最好。】
- (2) 往每个扩增后的 PCR 管内加入 5 μL 6× DNA 上样缓冲液 (MF144)。
- (3) 取上述含 DNA 上样缓冲液的 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。
- (4) 当溴酚蓝染料跑出上样孔 3-4 厘米左右时，停止电泳，拍照。

**【结果判断】**

PCR 扩增的结果有可能出现以下几种情况（表 2）：

表 2. PCR 扩增的可能结果

	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果	电泳结果
586 bp 内参条带	++	-	+	++	++	-
270 bp 左右条带	-	++++	+++	++	+	-
结果图示（见图 1）	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
支原体污染判断	阴性	极重度污染	重度污染	中度污染	轻度污染	PCR 被抑制

注：“-”代表没有条带；“+”代表有条带；“+”号越多代表条带越强。

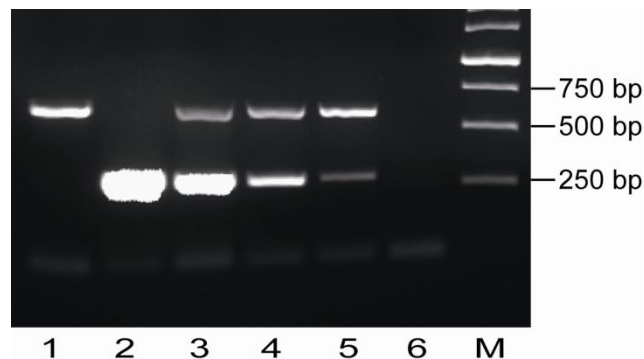


图 1. 支原体 PCR 扩增结果。586 bp 条带为内参条带，270 bp 左右的条带为支原体特异条带（各支原体的条带大小会略有不同，总体在 266-280 bp 之间。注意：支原体特异条带的大小不会超过该范围。超过该范围的，就是杂带！）。随着支原体 DNA 模板的增加，270 bp 左右的条带会逐渐增强而 586 bp 的内参条带会逐渐减弱，甚至消失。泳道 1：阴性对照或者没有支原体污染的样品；泳道 2：极重度支原体污染样品；泳道 3：重度污染样品；泳道 4：中度污染样品；泳道 5：轻度污染样品；泳道 6：PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制，导致扩增失败。M：DNA marker。

**【注意事项】**

- 每次检测都应该设有阴性对照，作用有：
  - 由于有效的 PCR 扩增，阴性对照也会有一条 586 bp 的内参条带，这样可以保证本试剂盒含有的支原体引物和内参以及自己准备的 Taq DNA 聚合酶，dNTP 等试剂没有问题；
  - 只有当阴性对照的结果没有出现 270 bp 左右的支原体特异条带时，其他样品的检测结果才是可信的。
- 每次试验阴性对照中 586 bp 的内参条带都必须出现而且要有一定的亮度，才说明试验成功。如果阴性对照的内参条带经常没有出现或者非常弱，说明试验不成功，这时可以采取以下几个措施：
  - 请使用普通蒸馏水或去离子水。不能使用去内毒素的水、DEPC 处理的水或者商品化的 DNase/RNase-free 的水，这几种水都可能会抑制 PCR 扩增的效率。
  - 请使用 Takara 公司的 Ex Taq Hot Start version（首选。货号：RR006A，可用 400 次。）或者 Ex Taq 酶（货号：RR001A，可用 400 次）。
  - 可以尝试增加 PCR 的循环数，比如：由原来的 40 个循环，增加到 45 个循环。
 如果采取以上几个措施后，阴性对照的内参条带仍然经常没有出现或者非常弱，请联系厂家解决。
- 如果个别样品有非特异性扩增，请使用 Takara Ex Taq Hot Start version（首选。货号：RR006A，可用 400 次。）
- 如果直接使用细胞培养液上清进行检测，而检测结果显示该样品 586 bp 条带和 270 bp 左右的条带都没有出现（如图 1，泳道 6）或者内参条带非常微弱，在排除 PCR 试剂的问题后（即阴性对照可以正常扩增），说明该样品含有抑制 PCR 扩增的代谢产物。
 

有关 PCR 的扩增会被细胞的代谢产物抑制的问题，Sigma 公司的 LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit（货号 MP0035）的 PCR 法支原体检测试剂盒说明书中也特别提到了这点，说明这是一个 PCR 法支原体检测中经常遇到的问题，其强烈建议用试剂盒进行 DNA 提取后再进行鉴定。这也是 PCR 法支原体检测的致命弱点。

为了克服该问题，您购买的 PCR 法支原体检测试剂盒，其扩增产物中必须含有内参（Internal Control）条带作为对照【本试

试剂盒的 586 bp 条带就是内参条带】。否则，如果没有内参作为对照，即使样品扩增后没有支原体特异条带，你也无法确定是因为样品确实没有支原体还是因为 PCR 被细胞的代谢产物抑制导致的假阴性。

如果出现 PCR 的扩增被细胞的代谢产物抑制时，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  $\mu$ L 上清；加 PBS 950  $\mu$ L，再次离心，吸走 950  $\mu$ L 上清；再加 PBS 950  $\mu$ L，第三次离心，吸走全部上清，用 20-50  $\mu$ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8 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、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。

6、防 DNA 污染注意事项：

- (1) 强烈建议所有操作全部使用进口滤芯吸头（比如：Axygen 滤芯吸头）进行操作，以免试剂被污染。
- (2) “PCR 体系配制的房间、移液枪”（不要使用细胞培养室的移液枪！）和“PCR 产物的电泳房间、移液枪”一定要分开，不能在同一个房间进行，也不能使用相同的移液枪进行操作。
- (3) PCR 产物是导致假阳性的最主要原因，PCR 产物不要在 PCR 体系配制的房间中打开。
- (4) 样品处理的房间和移液枪，如有条件，最好也分开。
- (5) 收到的支原体引物和内参，可以分装（比如 40 微升一支）后保存。
- (6) 如果发现阴性对照也出现阳性条带，说明发生 DNA 污染，必须将 PCR 所有的试剂、引物和水都换新的。

7、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  $10^{7-9}$ /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，这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。

8、**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）将 PCR 的循环数增加到 45 个循环。（3）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 20-50  $\mu$ L 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8 重悬沉淀，95  $^{\circ}$ 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 20-50 倍。（4）通过调整 PCR 反应体系，可以继续提高检测灵敏度 10 倍【调整后的 PCR 反应体系如下：PCR 的反应体积为 30  $\mu$ L、10 $\times$  Takara Ex Taq buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)为 3  $\mu$ L、2.5 mM dNTP 为 3  $\mu$ L、5 Units/ $\mu$ L Takara Ex Taq Hot Start version 0.125  $\mu$ L、支原体引物和内参的体积为 2  $\mu$ L、提取纯化后或者离心清洗后的待测样品 DNA 的体积为 20  $\mu$ L、阳性对照支原体 DNA 为 2  $\mu$ L、体系剩余部分加水补足到 30  $\mu$ L】。注意：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。

9、本说明书主要是利用细胞上清进行支原体污染检测，如果有客户想使用细胞本身而不是细胞培养上清进行支原体污染检测，请联系我们。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。