

M5 HiPer Mycoplasma Detector Kit (qPCR-TaqMan)

支原体探针法荧光定量检测试剂盒

使用说明书 (Version 2, 组分更少, 操作更简捷)

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Mycoplasma Detector Kit (qPCR-TaqMan)	25T	MF883-01

【储存条件】 -20°C保存, 有效期一年。

【产品组分】

Mycoplasma Detector Mix	850 μ L
Mycoplasma Detector Enzyme	25 μ L
Positive Control 阳性对照	25 μ L
Mycoplasma Detector IC	50 μ L
ddH ₂ O 超纯水	500 μ L

【产品简介】

Mycoplasma Detector Kit 是一款专门针对细胞培养中支原体污染的检测试剂盒, 使用荧光 PCR 探针法检测至少 125 种支原体。检测包括发酵支原体 (*M. fermentans*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. oral*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、鸡毒支原体 (*M. gallisepticum*)、肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)、滑液支原体 (*M. synoviae*) 等 104 种 Mycoplasmas; 莱氏无胆甾原体 (*A. laidlawii*) 等 5 种 Achleplasmas; 解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*) 等 3 种 Ureaplasmas 和 13 种 Spiroplasmas, 与环境常见菌如肠杆菌、肠球菌、葡萄球菌、沙雷菌、沙门菌、乳酸菌、念珠菌、曲霉菌等均无交叉反应。

试剂盒分为直扩法和提取法两种操作方法。直扩法使用简便, 无需支原体 DNA 的提取, 直接取 1 μ L 细胞培养液和 1 μ L 酶液加入到反应体系中即可上机检测。整个实验在一个半小时内完成。提取法可最大限度的检测到支原体的存在, 灵敏度极高, 对于常见支原体, 如发酵支原体 (*M. fermentans*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. oral*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、无乳支原体 (*M. agalactiae*)、牛支原体 (*M. bovis*)、鼠肺支原体 (*M. pulmonis*) 等均可达到 5 CFU/mL 的检出浓度。

本产品适用于各种悬浮、贴壁培养细胞, 包括 CHO、Vero、NS0、SP2/0、Sf9、293、HeLa 等, 且具有广泛的培养基兼容性。可为生物制药企业和科研院校提供简单、快速、可靠的支原体检测实验。

【注意事项】

1. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书, 实验应规范操作, 包括样本处理、反应体系的配制及加样。
2. 加样和配液步骤都尽量在冰上操作。
3. 每个组分在使用前都应震荡混匀, 低速离心。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【通用机型】 包含但不限于以下仪器: Bio-Rad: CFX96; Thermo Scientific: 7500 Real-Time PCR System; QuantStudio™ 5

【使用方法】

一、直扩法

1、待测样本的准备：待测的细胞培养液最好选用培养三天以上且汇合度在 70% 以上的细胞培养上清（贴壁细胞），无需离心。悬浮培养的细胞也需要在换液传代后培养 3 天以上，进行检测，直接取培养液即可，也无需离心。

2、反应体系的配制：将试剂盒从冰箱中取出，待融化后，震荡混匀。根据待测样本数量在离心管中按如下体系配制，并震荡混匀后以 39ul 分装到荧光 PCR 管中。

试剂	单次反应体积	N 次反应体积
Mycoplasma Detector Mix	31 μ L	31x1.1N
Mycoplasma Detector Enzyme	0.8 μ L	0.8x1.1N
Mycoplasma Detector IC	0.8 μ L	0.8x1.1N
ddH ₂ O 超纯水	6.4 μ L	6.4x1.1N

3、加样：在一只分装后的 PCR 管中加入 1ul 无模板水作为阴性对照，在另一只分装后的 PCR 管中加入 1ul Positive Control 作为阳性对照，其余的荧光 PCR 管均加入 1ul 待测的培养液作为检验孔。

二、提取法

1. 待测样本的准备：用支原体 DNA 提取试剂盒提取细胞培养液，提取时可加入 5ul 的 Mycoplasma Detector IC 进行质控。建议用 20-30ul 的洗脱液洗脱 DNA

2、反应体系的配制：将试剂盒从冰箱中取出，待融化后，震荡混匀。根据待测样本数量在离心管中按如下体系配制，并震荡混匀后以 32ul 分装到荧光 PCR 管中。

试剂	单次反应体积	N 次反应体积
Mycoplasma Detector Mix	31 μ L	31x1.1N
Mycoplasma Detector Enzyme	0.8 μ L	0.8x1.1N

3、加样：在一只分装后的 PCR 管中加入 7.2ul 无模板水和 0.8ul Mycoplasma Detector IC 作为阴性对照，在另一只分装后的 PCR 管中加入 7.2ul 无模板水，0.8ul Mycoplasma Detector IC 和 0.8ul Positive Control 作为阳性对照，其余的荧光 PCR 管均加入 8ul 提取好的 DNA 作为检验孔。

三、上机反应

将 PCR 管放入荧光定量 PCR 仪中，打开参数窗口，设置循环条件，反应程序如下：

反应阶段	温度	时间	是否检测荧光 (FAM 和 VIC)	循环数
UNG 酶水解	50 $^{\circ}$ C	2min	否	1
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	否	1
扩增及荧光收集阶段	95 $^{\circ}$ C	10sec	否	40
	60 $^{\circ}$ C	30sec	是	
降温阶段	25 $^{\circ}$ C	1min	否	1

注意：

1、试剂的配制和模板的加样要在不同的区域操作，避免气溶胶污染，实验结束后的 PCR 管切勿开盖，应包裹好后处理掉。

2、如果使用 roche 480 仪器，循环数需要设置成 45。

四、结果分析

本产品的支原体检测参考 FAM 通道的扩增曲线 Ct 值。VIC 通道为内标扩增曲线。实验结束后，按下列步骤进行实验分析和结果判断。

1、阳性对照：FAM 和 VIC 通道应均有扩增曲线，FAM 通道 $Ct \leq 34$ ，VIC 通道 $Ct \leq 34$ ，且呈现明显的扩增曲线。

2、阴性对照：FAM 通道检测无扩增曲线，VIC 通道 $Ct \leq 34$ 。

3、样本的检测结果判断：当上述阳性对照和阴性对照的结果满足后，分析样本检测孔 FAM 通道的 Ct 值。

A、当 FAM 通道的扩增曲线 $Ct \leq 36$ 时，判断为阳性。

B、当样本单孔检测时，若 FAM 通道的扩增曲线 $36 < Ct < 40$ ，且内标 VIC 通道 $Ct \leq 34$ 时，应进行复检。设置三个复检孔，若其中两个及以上复孔的 $Ct < 40$ ，则判断为阳性，否则判断为阴性。

C、当样本复孔检测时，出现一个或则两个孔的 FAM 通道 $36 < Ct < 40$ ，同样按照上述 B 的复检方法进行，判断为阳/阴性。

D、当 FAM 通道的扩增曲线 $Ct \geq 40$ 或无 Ct 值，且内标 VIC 通道 $Ct \leq 34$ 时，判断为阴性。

注意：当样本检测孔的 FAM 通道 Ct 较小时，VIC 通道扩增曲线可以不起峰，样本判断为阳性。



【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。