

探针法支原体污染实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Mycoplasma* Contamination

支原体（*Mycoplasma*）是一类原核细胞型微生物，属于柔膜菌纲（*Mollicutes*），常被用作柔膜菌纲的统称。支原体的直径约为 0.1-0.3 μm，是细胞外生存的最小类型微生物，无细胞壁，具有变形能力，可透过常见过滤膜（0.22-0.45 μm），因此常规的无菌过滤方法不能将其去除，靶向细胞壁的抗生素也对其无效。由于在光学显微镜下无法辨别，支原体常在不知不觉中污染体外培养的细胞。支原体种类繁多，目前已知的污染细胞的支原体有 20 多种，一般是由试剂和人工操作带入，95% 的污染事件是由常见的五种支原体引起；由原代细胞的原始组织带入而形成的污染也有发生，污染的支原体种类分布较为广泛。根据细胞类型、来源和培养方法的不同，文献报道的细胞污染率在 15-80% 之间，极大影响了下游实验的进行，因此必须使用专门的方法来检测。

对支原体的检测，传统上采用体外培养法，也是目前药典推荐的方法。培养法操作比较繁琐，需要很长时间（最长需要 28 天），受操作人员的实验技能影响比较大，并且有些支原体种类不能体外培养。而 PCR 法可有效克服上述缺点，检测时间短（仅需数小时），特异性强，灵敏度与培养法相当或更好，因此成为培养法的替代方案，并逐渐被各国政府接受。

本试剂盒采用探针法对细胞污染进行 PCR 检测，使用通用性探针和引物，可识别超过 150 种支原体。常见的污染类型，如：猪鼻支原体（*Mycoplasma hyorhinis*）、唾液支原体（*Mycoplasma salivarium*）、口腔支原体（*Mycoplasma orale*）、精氨酸支原体（*Mycoplasma arginini*）、莱氏无胆甾原体（*Acholeplasma laidlawii*）、发酵支原体（*Mycoplasma fermentans*）和肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*），均可以检出。根据易感程度和与人类的密切程度，选取 12 种支原体进行验证，灵敏度最高可达到每反应 2 个基因组，大部分种类灵敏度分布在每反应 2-12 个基因组，最低的是解脲脲原体，灵敏度为每反应 86 个基因组。将 DNA 或菌体溶入细胞培养上清后直接检测，灵敏度不受影响。本试剂盒适用于检测欧洲药典要求的所有支原体种类，大部分种类可以达到欧洲药典要求的 10 CFU/ml 的灵敏度，考虑到支原体培养条件和菌株活性的差异，个别种类的支原体难以判断是否符合这个要求。引物具有柔膜菌/支原体特异性，与真核生物无交叉反应，即使与亲缘关系较近的革兰氏阳性菌，如：丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）、嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）和肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*），也无交叉反应。本试剂盒适用于检测细胞培养物和细胞治疗产品中的支原体污染，也可用作支原体通用检测试剂盒，此时需注意本产品不适合嗜血支原体的检测。

试剂盒组成：

组份	成分	货号/规格/体积（微升）		
		lyco-qt-20	lyco-qt-50	lyco-qt-100
		20 次反应	50 次反应	100 次反应
1 份 A（蓝色管）	启动 Taq 酶，dNTPs，UDG 酶	200	500	1000
1 份 B（棕色管）	上下游引物，探针	40	100	200
1 份 C（黄色管）	阳性对照样品	40	100	200
ROX（棕色管）	5 μmol/L ROX	50	125	250
水（白色管）	无 DNA 酶超纯水	160	400	800

储存：-20℃，避光保存，有效期一年。避免反复冻融，频繁使用可置于 4℃ 保存。本产品可在 4℃ 保持稳定数周。

试剂盒特点：

- 1, 适用于检测细胞培养物和细胞治疗产品的支原体污染，可检测药典要求的全部支原体种类；也可作支原体通用试剂盒使用（不适合检测嗜血支原体），与其他细菌和真核生物无交叉反应。
- 2, 使用的 DNA 聚合酶具有抗抑制能力强和热稳定性好的特点；采用热启动方式，可抑制非特异性扩增。
- 3, 灵敏度高，最低可检出反应液中的 2 个基因组（与支原体种类有关）。
- 4, 带有阳性对照样品（组份 C），可用于检验试剂盒有效性。
- 5, 带有 UDG 酶和 dUTP，可降低残留 DNA 的污染。

操作步骤：

- 1, 准备好样品，抽提 DNA 后进行 PCR。本试剂盒使用的 DNA 聚合酶抗干扰能力强，对大多数使用 Tris 缓冲系统的样品可直接扩增，可先直接用样品进行 PCR 预实验，确认是否需要抽提 DNA。参考方法：将样品和组份 C 在同一管内进行 PCR，信号正常则说明样品中不含 PCR 抑制成分，可省去提取 DNA 步骤。
- 2, 将本试剂盒各组份置于室温充分融解，融解不完全可能导致实验结果异常，融解过程注意避光；手指轻弹管底以混匀，然后瞬时离心使液体沉降至管底；不可涡旋振荡。
- 3, 参考下表配制反应体系：反应体积 20 微升。将适量组份 A、组份 B、ROX 和水混合好之后，分装到 PCR 管中，最后加入待测样品或组份 C，阴性对照则加入与样品体积相同的水。注意避免剧烈操作，防止气溶胶污染。ROX 须根据仪器型号选择恰当浓度，必要时需先进行稀释再吸取适当体积（参考 http://www.biothrive.cn/vip_doc/30703411.html）。

体积（微升）	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管
组份 A	10	10	10
组份 B	2	2	2
组份 C	-	2	-
待测样品	-	-	2
ROX	x	x	x
水	8-x	6-x	6-x
总体积	20	20	20

- 4, 反应条件：50℃2 分钟，95℃4 分钟，然后以 95℃15 秒、60℃60 秒循环 40 次。
- 5, 探针在 5'-端以 FAM 修饰，3'-端以 MGB 修饰，在每个循环的结合阶段收集 FAM 荧光信号。Ct 值小于 35 为阳性，35-40 之间建议重复检测，大于 40 可能是非特异性扩增。

注意事项：

- 1, 试剂盒采用的 DNA 聚合酶抗干扰能力强，对大多数使用 Tris 缓冲系统的样品可直接扩增，对 PBS 缓冲液兼容性略差，反应液中血清浓度低于 5%时完全不受影响。
- 2, 配制反应体系时，尽量使用大体积移液。体积越大，移液误差越小。
- 3, PCR 非常灵敏，操作时产生的微量气溶胶即可造成样品之间的相互污染，因此须小心谨慎，避免剧烈操作。加液时枪头最好贴着管壁，所有管子用完即盖，对照和待测样品留在最后一步加入，取过样品的枪头用完即弃，尽量减少操作时污染的可能性。使用无污染的一次性枪头，最好是用带滤芯的枪头，在通风洁净区域操作。如长期使用本产品，请使用带滤芯的枪头，并注意避免环境 DNA 污染枪头。最好对工作区域进行划分，将不同步骤，如 DNA 提取和 PCR 反应液的配制，分开在不同阶段不同区域进行。操作时须佩戴无粉尘手套。由于健康人是支原体带菌者，操作时需注意防范。
- 4, 本产品仅限于科研使用，不作诊断用途。