



产品使用说明书

Rhinogen[®] Myco-Acid[™]

PCR 支原体检测试剂盒

货号：RA-MT06



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
保藏条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
应用	4
特性	5
操作方法	6
实验准备	6
操作方法	6
关于阳性	7
对照反应	7
操作说明	8
相关产品	9
联系我们	10

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Myco-Acid™ PCR支原体检测试剂盒包装规格如下：

试剂组分	货号	规格
		25 T
PCR Mix	RA-MT06A	250µl
阳性对照	RA-MT06B	10µl
1st PCR Primer Mix	RA-MT06C	10µl
2nd PCR Primer Mix	RA-MT06D	10µl

保藏条件 采用冰袋运输，收到产品后请立即置于-20℃及以下条件下储存。避免多次反复冻融。

产品综述

背景

支原体（Mycoplasma）是对支原体科、无胆甾原体科和螺原体科的原核微生物总称，是已知可以自由生活的最小生物，没有细胞壁，形状多样可变，直径一般是 0.1~0.3 μm ，基因组A-T 含量高，对常见的抗生素不敏感，对热敏感。目前已从污水、植物、动物、禽类、昆虫、人、温泉或其他高温环境中发现 200 种左右支原体。

细胞如果受到支原体污染，细胞生长速度变慢，细胞产生病变或形态改变。连续培养细胞污染的概率大约15~35%，主要来源于 20 多种支原体，包括口腔支原体（*M. orale*）、肺炎支原体（*M. pneumoniae*）、发酵支原体（*M. fermentans*）、精氨酸支原体（*M. arginini*）、莱氏无胆甾原体（*A. laidlawii*）和猪鼻支原体（*M. hyorhinitis*）。

人员操作、污染的细胞、原辅料（血清、胰酶、培养基），实验环境污染（生物安全柜、细胞间，培养箱）、实验仪器（水浴锅、液氮罐）、实验耗材（培养皿、方瓶、细胞工厂）都可能是污染源。污染了的细胞一方面对生产带来巨大影响，另外如果细胞产品、蛋白产品、病毒类产品受到支原体污染，最终会给患者带来潜在的健康风险。因此，监管部门要求企业对细胞库，检定用细胞和产品进行支原体检测，从源头上进行控制，尽早发现，确保放行产品不含支原体。对此，全球各国药物监管部门也发布了支原体检测相关指南，检测方法主要包括荧光染色法、培养法、生化检测方法和核酸扩增法。

上述检测方法中，大多操作步骤相对比较烦琐、灵敏性不高、不能区分支原体种类、需要特殊仪器或所需时间较长。而PCR法操作相对比较简单便捷，PCR扩增后通过电泳分析即可确定是否有支原体污染，并可根据扩增片段的大小大致预测至少11种所污染的支原体种属，也可以对PCR产物进一步测序以确定具体的支原体种属。

概述

Rhinogen[®] Myco-Acid[™] PCR支原体检测试剂盒是一种通过巢式PCR法（Nested PCR）检测培养细胞等生物材料中是否存在支原体污染的检测试剂盒。本支原体检测试剂盒是利用两对引物通过巢式PCR法特异性扩增支原体基因组DNA片段，从而实现对支原体的高灵敏度特异性检测的。

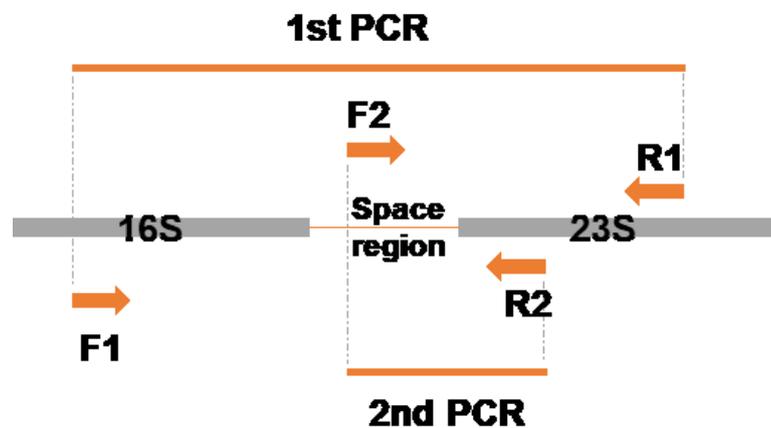


图1. Rhinogen[®] Myco-Acid[™] PCR支原体检测试剂盒的检测原理图

本试剂盒提供了PCR Mix（包含Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTP和Loading Buffer），扩增完毕后可以直接上样电泳，可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染。配套的阳性对照，便于确定PCR检测是否能正常工作及样品中是否存在抑制PCR反应的物质。原核生物的rRNA碱基序列非常保守，而rRNA操纵子上编码rRNA的DNA间隔区

(space region) 在各种生物种间的碱基序列差别很大，如16S和23S之间的间隔区。这个间隔区的DNA序列及长度在支原体各个种属间既有非常保守的部分，也有较大差异的部分。在编码16S和23S的保守区DNA上设计一对F1/R1引物，用于扩增16S和23S之间的间隔区，这就是巢式PCR的第一轮PCR（1st PCR），用于初步鉴定是否有支原体污染；然后在编码16S和23S rRNA的DNA间隔区的保守区上设计一条F2引物，在编码23S rRNA的DNA上设计一条R2引物进行巢式PCR的第二轮PCR（2nd PCR）。通过巢式PCR可以大大提高检测的特异性和灵敏度。

应用

本试剂盒确定可以扩增的支原体种类及1st PCR和2nd PCR扩增产物长度参考如下表：

种属	GenBank	1st PCR (bp)	2nd PCR (bp)
<i>Mycoplasma arginini</i>	JN935883	370	145
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	AY973560	408	157
<i>Mycoplasma capricolum</i>	AY800346	415	221
<i>Mycoplasma fermentans</i>	AY816338	492	195
<i>Mycoplasma hominis</i>	AY738737	370	148
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	JN935889	682	238
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	AY973572	452	211
<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	AY796063	502	196
<i>Mycoplasma orale</i>	AY737010	424	179
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	JN935865	477	190
<i>Mycoplasma salivarium</i>	AY786574	403	151
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	AY741673	482	154

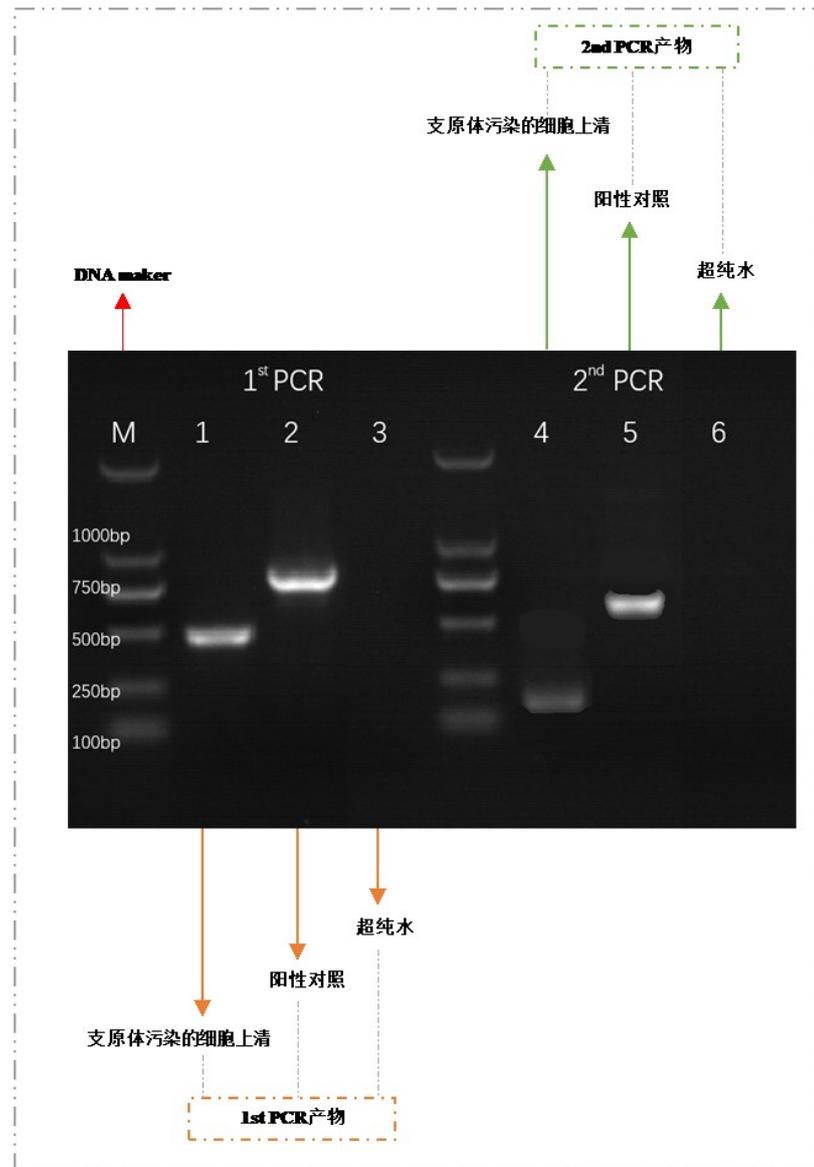


图2. Rhinogen® Myco-Acid™ PCR支原体检测试剂盒扩增产物的琼脂糖凝胶电泳示意图

注：1) 1、2、3是1st PCR产物，4、5、6是相应的2nd PCR产物；

2) 各泳道的模板分别是： 1和4：支原体污染的细胞上清；

2和5：阳性对照；

3和6：超纯水；

M：DNA marker。

特性

- ✓ 操作简单：试剂盒提供预混好的试剂，使体系配制操作简便；
- ✓ 快速检出：通过PCR扩增及电泳分析进行支原体检出只需4-5小时左右；
- ✓ 灵敏度高：PCR反应非常灵敏，可以扩增目的基因序列超过1000万倍；
- ✓ 特异性高：使用巢式PCR反应，提高了检测特异性。

操作方法

实验准备 需要用户自备的器材

- ✓ PCR 扩增仪；
- ✓ 琼脂糖凝胶电源装置；
- ✓ 微量离心机；
- ✓ 无菌 PCR 管、微量离心管枪头及移液器。

试剂和检测样品准备

- ✓ 无酶水或超纯水；
- ✓ 琼脂糖凝胶、电泳缓冲液、DNA Marker；
- ✓ 用于检测支原体污染的样品可以是细胞接种后培养了 3-6 天的培养上清液，或者是培养液、血清；如果使用细胞悬液做样品，则需要提取 DNA 后再进行 PCR。加入量一般为反应体系 1/10 的量或更少。如果样品会抑制 PCR 反应，建议对 DNA 进行抽提，再添加到 PCR 反应液中。

试剂盒准备

- ✓ 使用本产品前，一定要完全融化并轻轻混匀后使用，尽量避免产生气泡。所有试剂解冻并置于冰浴上或冰盒内。

操作方法

一、1st PCR 反应

1、按照以下的顺序配制反应混合液：

组分	最终浓度	体积	体积
超纯水	/	7.6-9.2μl	19-23μl
检测样品 (DNA) /阳性对照/超纯水	0.2pg/μl-20ng/μl	0.4-2μl	1-5μ
1st PCR Primer Mix	/	0.4μl	1μl
PCR Mix	/	10μl	25μl
总体积	/	20μl	50μl

注：阳性对照的推荐用量为1μl；超纯水可作为阴性对照。

2、将反应管放入PCR扩增仪中，PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

STEP1（起始变性）：94°C 30sec

STEP2（变性）：94°C 30sec

STEP3（退火）：55°C 2min

STEP4（延伸）：72°C 1min

STEP5（循环）：Go To STEP2 for 30-35 cycles

STEP6（最终延伸）：72°C 5min

STEP7（临时保存）：4°C forever

二、2nd PCR反应

1、按照以下的顺序配制反应混合液：

组分	最终浓度	体积	体积
超纯水	/	9.4μl	23.5μl
1st PCR产物	0.2pg/μl-20ng/μl	0.2μl	0.5μ
2nd PCR Primer Mix	/	0.4μl	1μl

PCR Mix	/	10 μ l	25 μ l
总体积	/	20 μ l	50 μ l

2、将反应管放入PCR扩增仪中，PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

STEP1（起始变性）：94°C 30sec

STEP2（变性）：94°C 30sec

STEP3（退火）：55°C 2min

STEP4（延伸）：72°C 1min

STEP5（循环）：Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6（最终延伸）：72°C 5min

STEP7（临时保存）：4°C forever

三、扩增产物电泳分析

1、电泳分析

反应结束后，取1st PCR及2nd PCR的反应产物各10 μ l，通过电泳确认扩增有无片段及片段大小。如果实验目的只是确定是否有支原体污染，1-2%的琼脂糖凝胶电泳均可；如果需要确定片段大小并据此大致推测污染支原体的种类，优先推荐使用2%的琼脂糖凝胶电泳。

2、结果判断

本试剂盒主要用于检测是否有支原体污染，但也可以通过1st PCR和2nd PCR扩增产物长度大致预测所污染的支原体种属（详见说明书“应用”部分“扩增产物长度参考表”）。如果有必要，也可以对PCR产物进行常规测序以确定具体的支原体种属（需要根据鉴定种属自行设计）。

关于阳性对照反应

1、阳性对照（Control template）可以单独使用，以确定PCR反应体系是否能正常工作。同时阳性对照也可以添加到样品中，以确定样品中是否含有抑制PCR反应的物质。Control template是人工合成的DNA片段，使用阳性对照时，1st PCR的反应产物约800bp，2nd PCR的反应产物约600bp。

2、如果阳性对照单独使用时没有获得扩增片段，提示PCR检测体系存在问题，需要考虑更换PCR反应相关试剂。

3、如果阳性对照单独使用时获得了预期的扩增片段，而阳性对照添加到样品一起进行PCR扩增反应时没有获得任何PCR扩增产物，提示PCR体系工作正常，但检测样品中存在抑制PCR反应的物质。此时建议将检测样品进行DNA抽提，再用提取的DNA作为模板进行扩增。也可以尝试将样品用超纯水或PBS适当稀释后再进行测试，此时如果样品中支原体的污染程度比较高，基本上不会影响检测，但如果样品中支原体的污染程度比较低，很可能会导致检测灵敏度显著下降。

4、如果阳性对照单独使用时获得了预期的扩增片段，而阳性对照添加到样品一起进行PCR扩增反应时可能仅获得支原体的PCR扩增产物或仅获得阳性对照的扩增产物，也可能同时获得支原体和阳性对照的扩增产物。其中一种模板量比较多时，通常更容易扩增获得哪种模板的PCR扩增产物。其中一种模板特别多时，另外一种模板可能检测不到明显的扩增。

操作说明

- 1、本试剂盒不能检出人肺炎支原体 (*M.pneumoniae*) ;
- 2、由于PCR反应非常灵敏,可以扩增目的基因序列超过1000万倍,在使用Taq酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染,并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。最好能在标准的PCR实验室中进行,没有标准PCR实验室的情况建议严格设置专用的PCR前区域和PCR后区域,两个区域必须在不同的房间并尽量间隔远一点以避免相互污染。PCR后区域的所有试剂、仪器、移液器、实验记录本等禁止带到PCR前区域。
- 3、建议使用带滤芯的吸头及专用的移液器配制PCR体系,这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。细胞培养使用过的移液枪可能会带有支原体污染。
- 4、实验操作过程尽量避免讲话,戴好一次性口罩,避免唾液中支原体的污染。
- 5、一般情况,1st PCR可以初步鉴定是否有支原体污染,但建议进行2nd PCR以进一步确认。
- 6、对2nd扩增产物进行核酸电泳时可能会同时出现1st的条带(该现象不会影响结果判断),这是由于1st扩增产物过多或1st引物浓度过高导致。如有必要,可以尝试减少1st扩增的循环数、优化1st引物用量或在2nd扩增时对1st产物进行适当稀释以减少1st产物用量。
- 7、本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品。

相关产品

产品名称	货号
MycoAlarm™ 支原体检测试剂盒	RA-MT01
Myco-Visal™ 一步法快速支原体检测试剂盒	RA-MT03
Myco-EXT™ 支原体DNA提取纯化试剂盒（磁珠法）	RA-MT04
Myco-Acid™ qPCR支原体检测试剂盒	RA-MT05
Myco-EXT™ 支原体DNA自动化提取试剂盒（非预装）	RA-MT07
Myco-EXT™ 支原体DNA自动化提取试剂盒（预装）	RA-MT08

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - 技术支持：techserv@rhinobio.com
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

