

研究用

Code No. RR277A

TaKaRa

TaKaRa Mycoplasma
qPCR Detection Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外所需试剂、器具、仪器	1
● 使用前的注意事项	2
● 操作注意事项	2
● 操作流程	3
● 实验例	6
● 补充：关于区域划分	9
● 关联产品	9

● 制品说明

本制品是用于细胞悬液中提取的DNA通过Real Time PCR方法检测支原体的试剂盒。引物探针在支原体16S rRNA至23S rRNA基因的区域设计，检测支原体的种类广泛。此外，试剂盒附带的Spike-in Control DNA可以对细胞样品的DNA提取操作过程进行确认。

本制品是在日本科学技术振兴机构 (JST) 和日本医学研究开发机构(AMED)再生医学实现研究中心网的共同支持下，以东京医科齿科大学干细胞与再生医学中心的清水则夫博士的研究成果为基础，由清水博士和Takara Bio株式会社共同研究开发而成。

● 制品内容(96 Tests): 192 次支原体检测反应, 96 次 Spike-in Control DNA 检测反应*1

●	1. Probe qPCR Mix	2.5 ×	960 μl	× 3
②	2. Primer/Probe Mix (Myco)*2	12.5 ×	384 μl	
③	3. Primer/Probe Mix (Spike-in)*2	12.5 ×	192 μl	
H ₂ O	4. H ₂ O		1 ml	× 2
●	5. Positive Control (Myco)	(1 × 10 ⁴ copies/μl)	300 μl	
●	6. PC Dilution Buffer*3		1 ml	× 2
●	7. Spike-in Control DNA		1 ml	

* 1: 关于反应次数的说明

每个样品，同时进行2个支原体检测反应和1个Spike-in Control DNA检测反应。

		支原体检出用	Spike-in Control DNA检出用	反应总数
样品数	1个样品	2	1	3
	7个样品	14	7	21
	31个样品	62	31	93

每次实验，阳性对照和阴性对照的反应次数如下：

	支原体检出用	Spike-in Control DNA检出用	反应总数
阴性对照(H ₂ O)	1	1	2
阳性对照	1	0	1

本产品可进行的检测次数如下。

对1个样品进行检测实验：48次，(4 Myco × 48, 2 Spike-in × 48)

对7个样品进行检测实验：12次，(16 Myco × 12, 8 Spike-in × 12)

对31个样品进行检测实验：3次，(64 Myco × 3, 32 Spike-in × 3)

* 2: 含有荧光标记探针 (FAM标记)，请注意避光保存。

* 3: 用于稀释阳性对照(Myco)。

● 保 存: -20°C。

● 试剂盒外所需试剂、器具、仪器

- 核酸提取试剂盒
NucleoSpin Mycoplasma DNA (Code No. 740860.50) 等
- 微量移液枪和配套枪头
- Real Time PCR 仪
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980)

Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960, 已终卖)
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
LightCycler 480 system (Roche Diagnostics)
CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 等

- 加热块
- 高速微量离心机

● 使用前的注意事项

使用本制品时的注意事项。使用前请务必阅读。

该试剂盒设计用于检测支原体 DNA，也可以检测非活菌。另外，设计的 Probe/Primer 所覆盖的序列中发生突变或缺失/插入时，可能会出现无法检测到支原体 DNA 的情况。

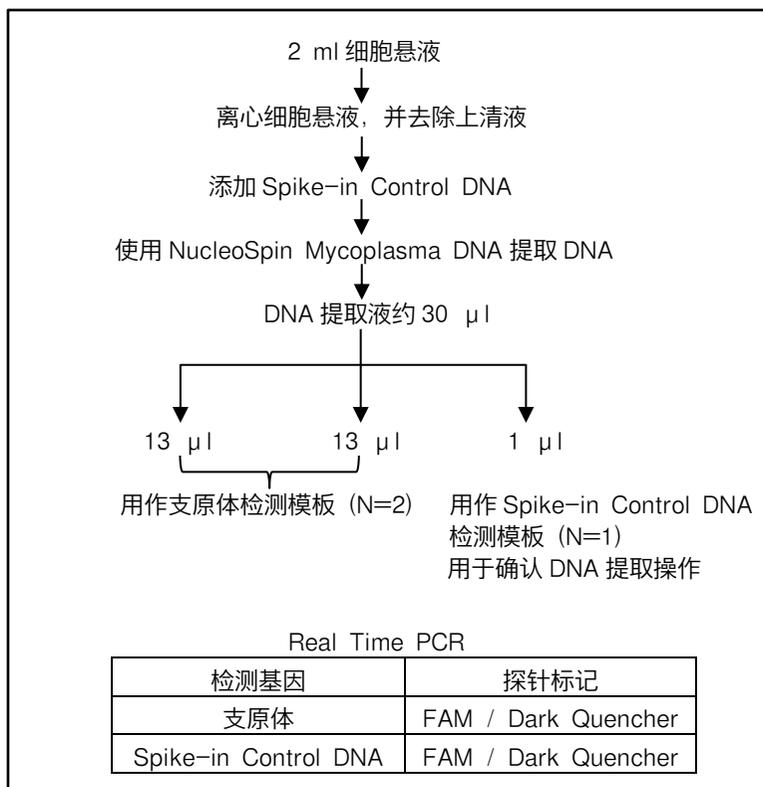
(关于检测结果判定时产生的相关问题，Takara Bio 不承担任何责任。)

● 操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用，请按照各仪器说明书进行。
2. 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意。
3. 建议从反应液的配制到添加样品的实验过程中设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。在各区域要避免开闭含有扩增产物的反应管。
区域 1：反应液的配制及分装。
区域 2：检测样品的制备。
区域 3：向反应液中添加检测样品，进行反应和检测。
由于本制品使用 Real Time PCR 法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳或其他分析方法。为了避免污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。
4. 本制品通过 Real Time PCR 仪的分析确定结果。
如果 Real Time PCR 仪上任何自动功能的故障，都可能会导致错误判断。如有必要，请按照仪器说明书调整 Real Time PCR 仪器上的设置。

● 操作流程

将 2 ml 培养细胞悬液离心浓缩后提取 DNA，以其作为 Real Time PCR 反应的模板，进行 2 个支原体检测反应，1 个 Spike-in Control DNA 检测反应。



在支原体检测的 2 个反应中，有 2 个反应或 1 个反应中计算出 Ct 值时，则判定为支原体阳性。

A. DNA提取（在区域2进行）

从样品中提取DNA。在提取过程中，添加Spike-in Control DNA以确认提取操作。以下是使用NucleoSpin Mycoplasma DNA (Code No. 740860.50) 作为示例的操作方法。

1. 细胞的回收

将 2 ml 细胞悬液 (约 2×10^6 个细胞) 在 15,000 rpm 离心 5 分钟，去除 1,810 μ l 上清液 (保留 190 μ l)。

2. Spike-in Control DNA 的添加

添加 10 μ l Spike-in Control DNA。

3. 按如下步骤溶解样品

加入 5 μ l Proteinase K 溶液 (NucleoSpin Mycoplasma DNA Kit 中组分)。

加入 200 μ l Lysis Buffer SML，振荡混匀 10~15 秒。

加入 5.6 μ l Carrier RNA Stock 溶液*1，轻柔混匀。

在室温条件下，静置 3 分钟。

4. 添加乙醇

添加 200 μ l 乙醇 (96~100%)，振荡混匀 10~15 秒。

在室温条件下，静置 5 分钟。

5. 柱吸附

将NucleoSpin Mycoplasma DNA Column置于Collection Tube (2 ml) 中。

将步骤4中制备的溶液加入Column中, $4,000 \times g$ 离心3分钟。^{*2}

弃去滤液后, 将柱子置于新的2 ml Collection Tube中。

6. 膜清洗

第1次清洗

向柱子中添加400 μ l Wash Buffer SMW1, $11,000 \times g$ 离心30秒。

弃去滤液后, 将柱子置于新的2 ml Collection Tube中。

第2次清洗

向柱子中添加400 μ l Wash Buffer SMW2^{*3}, $11,000 \times g$ 离心30秒。

弃去滤液后, 将柱子置于新的2 ml Collection Tube中。

第3次清洗

向柱子中添加200 μ l Wash Buffer SMW2, 以最大转速(最大 $20,000 \times g$)离心5分钟。

弃去滤液后, 将柱子置于新的Collection Tube (1.5 ml) 中。

7. 膜干燥

打开柱盖, 在 56°C 条件下, 干燥5分钟。

8. DNA的洗脱

加入34 μ l^{*4}预热至 70°C 的RNase-free H₂O, 在室温条件下, 孵育3分钟。

$20,000 \times g$ 离心3分钟, 洗脱DNA。

洗脱的DNA溶液(约30 μ l)^{*5}不立即使用时, 请在 -20°C 保存。

* 1: Carrier RNA Stock溶液的配制方法

[使用Code No. 740860.50时]

向300 μ g冻干的Carrier RNA中, 加入300 μ l RNase-free H₂O溶解。

溶解后, 请在 -20°C 保存。

* 2: 如果此离心操作后柱子有液体残留, 则进行1分钟的高速离心 ($15,000 \sim 20,800 \times g$)。如果柱子中仍然有溶液残留, 建议用新的样品重新进行DNA提取。

* 3: Wash Buffer SMW2的配制方法

[使用Code No. 740860.50时]

向12 ml Wash Buffer SMW2 (浓缩液) 中, 添加48 ml乙醇 (96~100%)。

* 4: 在使用微量移液器进行移液之前, 请预先用枪头吸打几次。

* 5: 需要27 μ l DNA溶液作为Real Time PCR的模板。洗脱DNA溶液不足27 μ l时, 请用H₂O将其补足至30 μ l。

B. Real Time PCR反应液的制备

制备用于支原体和Spike-in Control DNA检测的2种反应液, 并以步骤A提取的DNA为模板, 进行Real Time PCR。

1. 在冰上制备以下反应液 (在区域1进行)

配制所需数量+ α 份的反应液。

<支原体检测>

※制备样品数 × 2 + 2 (阳性对照、阴性对照 (H₂O)) 的反应液。

【1个反应使用量】

试剂	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μl
② Primer/Probe Mix (Myco)	2 μl
Total	12 μl

<Spike-in Control DNA检测>

※制备样品数 + 1 (阴性对照 (H₂O)) 的反应液。

【1个反应使用量】

试剂	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μl
③ Primer/Probe Mix (Spike-in)	2 μl
● H ₂ O	12 μl
Total	24 μl

2. 将步骤1中制备的反应液加入Real Time PCR反应管中。(在区域1进行)

支原体检测: 每个反应管添加12 μl

Spike-in Control DNA检测: 每个反应管添加24 μl

3. 添加A-8的DNA溶液 (或阳性对照 (Myco) 或H₂O)。(在区域3进行)

支原体检测: 每个反应管添加13 μl

Spike-in Control DNA检测: 每个反应管添加1 μl

4. 在以下条件下进行反应。

预变性

95°C 30秒

PCR: 5 cycles

95°C 5秒

60°C 1分钟

PCR: 40 cycles

90°C 1秒

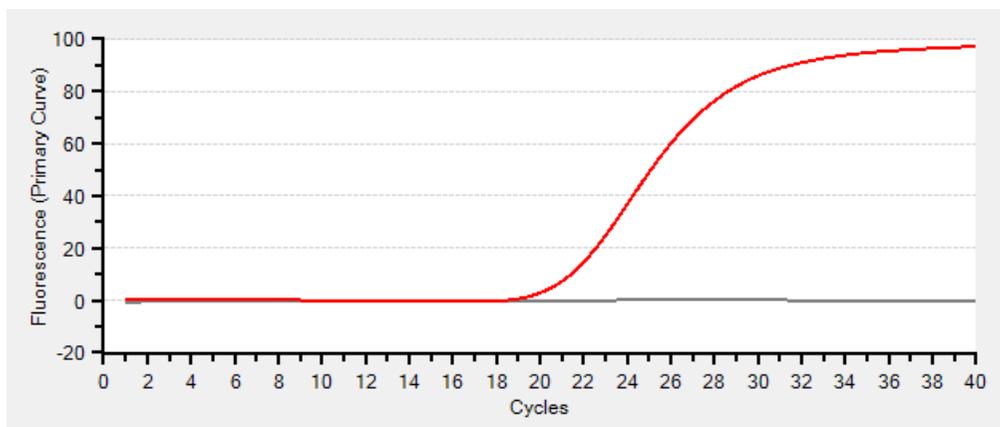
60°C 1分钟 (FAM检测)

※ 使用Thermal Cycler Dice Real Time System III//仪器时, Speed请选择Fast。

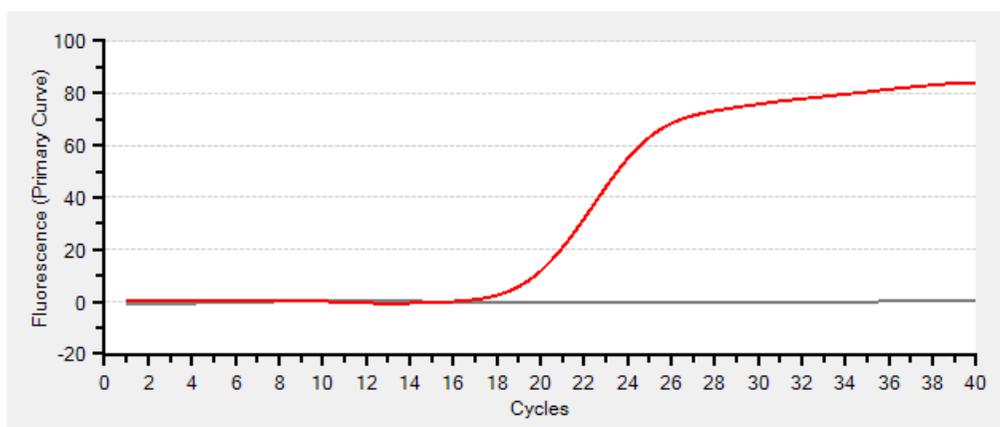
● 实验例

使用Thermal Cycler Dice Real Time System III的实验例如下所示。

<阳性对照 (Myco) 检测>



<Spike-in Control DNA检测>



● 性能评价

性能评价测试结果是使用NucleoSpin Virus试剂盒获得的，该试剂盒在技术上与NucleoSpin Mycoplasma DNA试剂盒相当。NucleoSpin Mycoplasma DNA试剂盒是按照更严格的卫生标准生产的，所有批次试剂盒均在特定条件下，检测不到支原体污染。

由于本制品在最初的5 cycles内不进行荧光检测，而在随后的40 cycles内进行荧光检测。因此，PCR仪器上计算出的Ct值比实际PCR cycles数值小5。本项的结果在实验中获得Ct值上加5，将Ct值显示为PCR循环的实际次数。

A. 覆盖度

<方法> 使用7种市售支原体基因组DNA，以约10 pg的DNA作为模板，对每个样品使用本试剂盒进行Real Time PCR检测 (N=2)。

<结果> 表1显示了使用的支原体种类和通过Real Time PCR检测获得的Ct值。经确认，所有7种支原体基因组DNA均得到良好检出。

表1. 支原体种类和试验结果

No.	物种	ATCC No.	模板添加量	Ct1	Ct2	平均值
1	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	19611D	10 pg	27.4	27.4	27.4
2	<i>Mycoplasma bovis</i>	25523D	10 pg	24.4	24.5	24.4
3	<i>Mycoplasma hominis</i>	23114D	10 pg	23.2	23.2	23.2
4	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	25934D	10 pg	24.0	24.0	24.0
5	<i>Mycoplasma pirum</i>	25960D	10 pg	26.4	26.4	26.4
6	<i>Mycoplasma synoviae</i>	qCRM-25204D	10 ⁴ copies	23.5	23.4	23.4
7	<i>Spiroplasma citri</i>	27556D-5	10 pg	25.9	26.0	25.9

B. 特异性

<方法> 使用13种市售细菌基因组DNA，以约100 pg的DNA作为模板，对每个样品使用本试剂盒进行Real Time PCR检测 (N=2)。

<结果> 表2显示了使用的细菌种类和通过Real Time PCR检测获得的Ct值。未检测到与任何细菌基因组DNA存在交叉反应。

表2. 支原体以外的细菌种类和试验结果

No.	物种	NBRC No.	模板添加量	Ct1	Ct2
1	<i>Bacillus subtilis</i>	13719G	100 pg	--	--
2	<i>Brevibacillus brevis</i>	100599G	100 pg	--	--
3	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	13948G	100 pg	--	--
4	<i>Clostridium kluyveri</i>	12016G	100 pg	--	--
5	<i>Escherichia coli</i>	12713G	100 pg	--	--
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14940G	100 pg	--	--
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	106052G	100 pg	--	--
8	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	13245G	100 pg	--	--
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	100910G	100 pg	--	--
10	<i>Streptococcus mutans</i>	13955G	100 pg	--	--
11	<i>Streptomyces avermitilis</i>	14893G	100 pg	--	--
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100887G	100 pg	--	--
13	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	12172G	100 pg	--	--

C. 灵敏度

<方法> 使用来自ATCC的7种不同物种的支原体标准品 (表3)，对本制品的95%阳性临界值进行了确认。准备10⁶个细胞/ml的CHO细胞，向其中添加支原体标准品，使其浓度为1、10、100 cfu/ml (对

于肺炎支原体0.1、1和10 ccu/ml), 进行了DNA提取及利用本制品检测。支原体标准品采用梯度稀释, 每个浓度设置4个平行反应。

在10 cfu/ml的各稀释液中, DNA提取和Real Time PCR各重复进行6次, 共得到24个结果。在1 cfu/ml和100 cfu/ml的各稀释液中, DNA提取和Real Time PCR各重复进行2次, 共得到8个结果。

表3. 不同物种的支原体标准品

物种	ATCC No.	Lot No.	Post-preservation titer	Genome copy(GC)
<i>Mycoplasma arginini</i>	23838-TTR	60224014	3.70×10^9 cfu/ml	8.93×10^9 GC/ml
<i>Mycoplasma fermentans</i>	19989-TTR	60316337	1.00×10^9 cfu/ml	8.61×10^9 GC/ml
<i>Mycoplasma salivarium</i>	23064-TTR	60171952	1.67×10^9 cfu/ml	3.80×10^9 GC/ml
<i>Mycoplasma orale</i>	23714-TTR	61060921	3.08×10^8 cfu/ml	1.54×10^9 GC/ml
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	17981-TTR	63478133	8.77×10^8 cfu/ml	1.23×10^9 GC/ml
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	23206-TTR	60171953	7.10×10^8 cfu/ml	5.86×10^9 GC/ml
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	15531-TTR	60171955	1.00×10^8 ccu/ml	5.82×10^9 GC/ml

<结果> 灵敏度检测结果如表 4 和表 5 所示。表 4 列出了每项检测的 Ct 值的平均值和标准差。表 5 汇总了每项检测判定为阳性的数量和占比*。

对于所有 7 种支原体, 显示 95%阳性结果的临界值为 10 cfu/ml 或更低(肺炎支原体为 1 ccu/ml)。

* 检测结果显示一个或两个反应的 Ct 值为“阳性”。

表4. Ct values

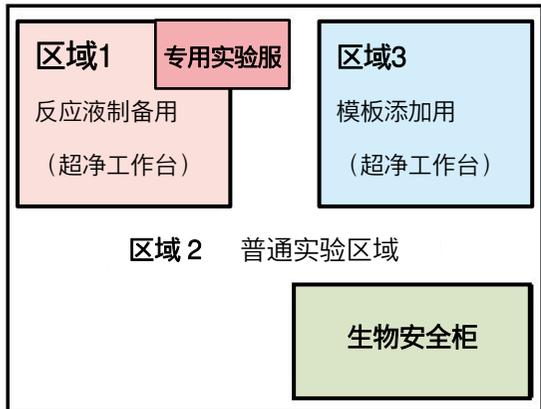
	Ct 平均值			Ct SD 值		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	33.0	36.2	39.7	0.356	0.995	2.003
<i>M. fermentans</i>	31.9	35.5	38.8	0.385	0.828	0.952
<i>M. salivarium</i>	33.3	37.0	39.2	0.532	0.857	1.853
<i>M. orale</i>	33.8	38.1	39.1	0.293	1.336	0.650
<i>M. hyorhinis</i>	31.3	35.4	39.7	0.402	0.550	2.470
<i>A. laidlawii</i>	30.6	35.2	39.2	0.512	1.908	1.585

	Ct 平均值			Ct SD 值		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	33.2	36.5	40.0	0.397	1.132	1.898

表5. 阳性检测数和百分比

	阳性检测数			阳性率%		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	8/8	24/24	6/8	100.0	100.0	75.0
<i>M. fermentans</i>	8/8	24/24	5/8	100.0	100.0	62.5
<i>M. salivarium</i>	8/8	24/24	6/8	100.0	100.0	75.0
<i>M. orale</i>	8/8	24/24	5/8	100.0	100.0	62.5
<i>M. hyorhinis</i>	8/8	24/24	8/8	100.0	100.0	100.0
<i>A. laidlawii</i>	8/8	24/24	8/8	100.0	100.0	100.0
	阳性检测数			阳性率%		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	8/8	24/24	3/8	100.0	100.0	37.5

● 补充：关于区域划分



- 区域 1：反应试剂配制区域
进行 Real time PCR 反应液的配制及分装。
(无模板操作区)
- 区域 2：普通实验区域
进行样品的处理及 DNA 的制备。
根据需要设置生物安全柜。
- 区域 3：处理高浓度 DNA 的区域
在分装完成的反应液中添加模板 DNA。
标准品的稀释也在此进行。

● 关联产品

- Virus Test Kit (HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19) Ver.2 (Code No. RR273A)
- Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV) Ver.2 (Code No. RR274A)
- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III with PC (Code No. TP970)
- 0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (Code No. NJ907)
- FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate (Code No. NJ904)
- 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)
- NucleoSpin Mycoplasma DNA (Code No. 740860.50)

Thermal Cycler Dice is a trademarks of Takara Bio Inc.

FrameStar is a registered trademark of Azenta Life Sciences.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202504Da