



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0303S	BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒	100次
C0303M	BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒(BeyoDirect™ Mycoplasma qPCR Detection Kit), 是一种无须提取样品中DNA或RNA, 可以直接使用细胞培养液或血清等样品, 通过探针法qPCR (Quantitative PCR)高灵敏检测培养的细胞等生物材料中是否有支原体污染的试剂盒。本试剂盒可快速、有效、高灵敏地检测支原体污染。
- 支原体(Mycoplasma)是最小、最简单的原核生物。支原体有如下特征: 支原体无细胞壁结构, 所以针对细胞壁的许多常见的抗生素, 如青霉素或β-内酰胺类抗生素对支原体无效; 支原体大小介于细菌和病毒之间, 约为0.2-0.8μm, 所以部分支原体可通过0.22 μm滤器, 常规的过滤对支原体无效; 很多支原体由于自身的生物合成能力有限而依靠宿主提供营养, 所以通常吸附或散落在细胞表面和细胞之间。支原体的这些特征使细胞培养过程中存在支原体污染的风险, 细胞的支原体污染已经成为一个世界性的普遍问题[1]。
- 支原体污染可能会严重影响细胞的状态, 使细胞的基因表达、代谢特征发生变化, 导致细胞生长减缓、分化和死亡异常, 严重影响细胞功能。这些影响因素会严重影响实验结果的可靠性、可重复性和一致性, 因此支原体污染的检测非常重要。
- 细胞培养过程中的细菌、酵母或霉菌污染在光学显微镜下可见, 但支原体污染在光学显微镜下通常不可见, 必须通过特定的检测方法进行检测。检测支原体污染的常用方法有支原体分离培养、ELISA、发光法等特殊的生化检测以及DNA荧光染色检测等。上述检测方法中, 大多操作步骤相对比较烦琐、灵敏性不高或所需时间较长。而qPCR法操作方便简单, PCR扩增后无需电泳分析即可确定是否有支原体污染。
- 本试剂盒根据支原体基因组中保守的23S rRNA操纵子编码区序列[2], 设计特异性引物和荧光探针(FAM标记), 可直接以细胞培养液上清或血清等生物材料为模板进行检测。本试剂盒可以扩增和检测39种支原体。本试剂盒特异性扩增支原体DNA, 对细菌、真菌、真核细胞DNA不扩增。
- 本试剂盒提供了qPCR实验所需的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、引物、探针、PCR Buffer、dNTPs、稳定剂、Nuclease-free Water和镁离子等所有的通用组分。本试剂盒还包含Internal Control DNA (VIC标记), 即内对照DNA, 用于添加到每个PCR反应中, 检测是否有抑制PCR反应物质。此外, 本试剂盒提供Positive Control, 即阳性对照, 可用于检测试剂盒本身是否能正常工作。

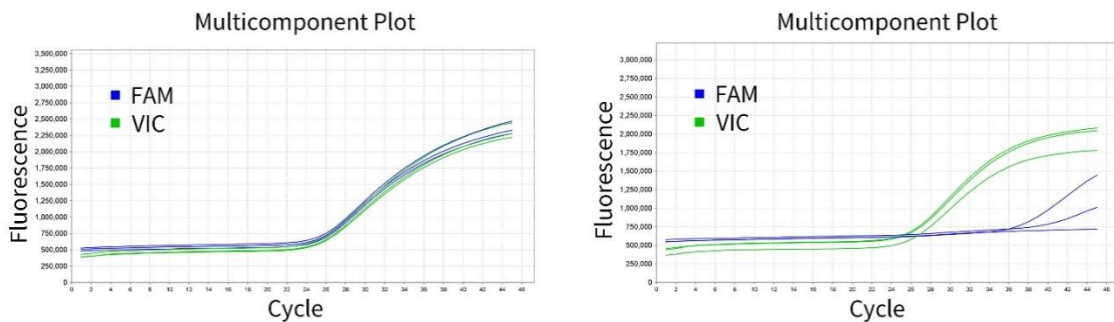


图1. 碧云天支原体qPCR检测试剂盒(C0303)用于阳性对照和阴性对照的检测效果图。左图是试剂盒中的阳性对照, 右图是试剂盒中的Nuclease-free water作为阴性对照, 两组对照同时添加了内参对照DNA, FAM为支原体检测信号, VIC为内参对照检测信号。左图的支原体内对照检测曲线正常, 而右图仅内参对照检测曲线正常, 支原体为阴性。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒适用于具有FAM和VIC检测通道的荧光定量PCR仪, 如ABI的7500、7900、StepOne、QuantStudio系列, Roche的LightCycler480、SmartCycler, Bio-Rad的CFX96、Chromo4、Opticon 2、iCycler IQ、iQ5, Qiagen的Rotor Gene 6000, 上海宏石SLAN-96P等。
- 本试剂盒进行了相关优化, 可直接检测含支原体的细胞培养液上清、血清等样品, 无须单独提取DNA。本试剂盒所用检测方法非常灵敏, 通过阳性对照计算出的检测下限约为2-20 copies/μl。
- 如果发现支原体污染, 优先建议更换无污染的培养液进行培养。如果有必要预防或去除支原体, 可使用专用的支原体预防或去除试剂, 如支原体清除试剂(C0288)、支原体清除试剂Plus (C0290)、支原体预防去除试剂I (C0292)、支原体预防去除试剂II (C0293)、Myc0-Zero™支原体去除试剂(C0280)、Myc0-Zero™ Plus支原体去除试剂(C0285)。

- 本产品如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl)或384孔板qPCR检测(建议反应体系为10μl), 本产品小包装分别可以进行100次和200次检测, 中包装分别可进行500次和1000次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0303S-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	1ml
C0303S-2	Primer Probe Mix	200μl
C0303S-3	Internal Control DNA	100μl
C0303S-4	Positive Control	200μl
C0303S-5	Nuclease-free Water	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0303M-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	5ml
C0303M-2	Primer Probe Mix	1ml
C0303M-3	Internal Control DNA	500μl
C0303M-4	Positive Control	1ml
C0303M-5	Nuclease-free Water	5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)和Primer Probe Mix需要-20°C避光保存。尽量避免反复冻融。

注意事项:

- 使用前需确保试剂完全融化, 上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)和Primer Probe Mix中含有荧光染料, 保存本产品或设置PCR反应时应避免强光照射, 以尽量避免荧光淬灭问题。
- 经测试, 本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响, 但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测, 请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。请勿在PCR反应设置区域撕开PCR封板膜或打开PCR管盖, PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理, 以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 本试剂盒可以检测出细胞污染的常见支原体种类, 对于少数怀疑可能有不能鉴定的支原体种类污染的比较重要的细胞, 推荐使用碧云天Mycro-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(C0297/C0298)进行双重检测。严格的支原体检测, 需使用两种以上不同原理的方法同时检测, 才能最有效的避免假阳性和假阴性。
- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系, 这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)
- 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, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂:

- 具有FAM和VIC/HEX/JOE荧光通道的荧光定量PCR仪。
- DNase-free、RNase-free的吸头、离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜。

2. 样本准备:

可用于检测支原体污染的样品: 细胞接种后培养了3-6天的培养上清液、细胞培养液、血清。如使用细胞悬液做样品, 则需要提取DNA后再进行PCR。**注1:** 青霉素和链霉素对PCR反应无抑制作用。**注2:** 样品加入量一般为反应体系1/10的量或更少。如果样品不能及时检测, 可以置于-20°C或者-80°C保存。

3. qPCR反应体系的设置:

- 融解并混匀反应所需的各种溶液, 置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置qPCR反应体系(以96孔板, 每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、阴性对照(Negative Control)或阳性对照(Positive Control)。Negative Control可使用Nuclease-free Water。建议每次检测都设置Negative control和Positive control。如果确定没有抑制PCR反应的物质, 可以不添加Internal Control DNA。

Reagent	Volume
BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	10μl
Primer Probe Mix	2μl
Template	2μl

Internal Control DNA	1µl
Nuclease-free Water	5µl
Total Volume	20µl

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- d. 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。
- e. 荧光检测通道的选择：Internal Control DNA探针的荧光基团是VIC，可选择检测通道(Reporter)为VIC/HEX/JOE，淬灭基团(Quencher)是BHQ1，如果没有BHQ1，则选择无；支原体探针的荧光基团是FAM，可选择检测通道为FAM，淬灭基团是BHQ3，如果没有BHQ3，则选择无。请将仪器的荧光内参设置为‘None’，例如：对于ABI系列仪器，将‘Passive Reference’设置为‘None’。

4. qPCR反应程序：

本试剂盒建议采用如下的qPCR程序，本程序是以QuantStudio™ 6 Flex Systems荧光定量PCR仪为例：

- a. 预变性：95°C 2min
- b. 变性：95°C 15sec
- c. 退火/延伸：60°C 20sec
- d. 重复步骤b和步骤c，总共40个循环
- e. 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果

5. 结果的定性判断：

- a. 阳性对照：FAM通道和VIC通道呈典型S型扩增曲线且Ct值≤33。
- b. 阴性对照：FAM通道无典型S型扩增曲线或Ct值>35，VIC通道呈典型S型扩增曲线且Ct值≤33。
- c. 样品阳性：如果待测样本检测结果FAM通道和VIC通道均呈典型S型扩增曲线且Ct值≤33，且阳性对照品检测结果为阳性，阴性对照品检测结果为阴性，此次结果判断为支原体阳性。
- d. 样品阴性：如果待测样本检测结果FAM通道无典型S型扩增曲线或Ct值>35，VIC通道呈典型S型扩增曲线且Ct值≤33，且阳性对照品检测结果为阳性，阴性对照品检测结果为阴性，此次结果判断为支原体阴性。
- e. 可疑：如果FAM通道33<Ct值≤35，则此样本应培养2-3天后重新取样后再次进行检测。
- f. 出现PCR抑制现象的，可以适当稀释或用核酸抽提试剂盒，提取DNA后再做PCR鉴定。

支原体探针(FAM标记)	内对照探针(VIC标记)	结果判断
典型S型扩增曲线且Ct值≤33	典型S型扩增曲线且Ct值≤33	阳性
无典型S型扩增曲线或Ct值>35	典型S型扩增曲线且Ct值≤33	阴性
无典型S型扩增曲线或Ct值>35	无典型S型扩增曲线或Ct值>35	PCR抑制

参考文献：

1. Rawadi G, Dussurget O. Prokaryotes. 1995. 20: 20.
2. Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H. et al. Dev.Biol.-Animal 2006. 42, 63–69.

附录：

本试剂盒可以扩增的支原体种类：

种属	种属	种属
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	<i>Mycoplasma cloacale</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	<i>Mycoplasma columbinasale</i>	<i>Mycoplasma hyopharyngis</i>
<i>Mycoplasma anseris</i>	<i>Mycoplasma columbinum</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma lagogenitalium</i>
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	<i>Mycoplasma dispar</i>	<i>Mycoplasma leachii</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i>
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	<i>Mycoplasma flocculare</i>	<i>Mycoplasma neurolyticum</i>
<i>Mycoplasma californicum</i>	<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Mycoplasma canadense</i>	<i>Mycoplasma gallinarum</i>	<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>
<i>Mycoplasma capricolum</i>	<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Mycoplasma citelli</i>	<i>Mycoplasma glycyphilum</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>

注：黑标的为细胞培养过程中最常见的种类。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0280S	Myc0-Zero™支原体去除试剂	5次

C0280M	Myco-Zero™支原体去除试剂	20次
C0280L	Myco-Zero™支原体去除试剂	100次
C0283-500ml	Myco-Zero™支原体去除喷雾剂	500ml
C0283-2L	Myco-Zero™支原体去除喷雾剂	2L
C0285S	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	10次
C0285M	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	50次
C0285L	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	200次
C0288S	支原体清除试剂	20mg
C0288M	支原体清除试剂	100mg
C0290S	支原体清除试剂Plus	10mg
C0290M	支原体清除试剂Plus	50mg
C0292-2ml	支原体预防去除试剂I	2ml
C0292-10ml	支原体预防去除试剂I	10ml
C0293-2ml	支原体预防去除试剂II	2ml
C0293-10ml	支原体预防去除试剂II	10ml
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
C0297S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	20次
C0297M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	100次
C0298S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	20次
C0298M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	100次
C0299S	Myco-Lumi™发光法支原体检测阳性对照	20次
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次
C0303S	BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒	100次
C0303M	BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒	500次
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装

Version 2023.02.16