



Mycoplasma Detector Kit

(qPCR-TaqMan)

Cat.No. CW3026S (40 rxns)

保存条件： -20℃，避光保存，如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW3026S 40 rxns
Mycoplasma Detector Mix	2×850 μL
Mycoplasma Detector Enzyme	50 μL
Positive Control	50 μL
ddH ₂ O	1 mL

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. pneumonia*）、滑液支原体（*M. synoviae*）等104种Mycoplasmas；莱氏无胆甾原体（*A. laidlawii*）等5种Acholeplasmas；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 μL 细胞培养液和1 μL 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。

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49 μL 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	39 μL	39 \times 1.1N
Mycoplasma Detector Enzyme	1 μL	1 \times 1.1N
ddH ₂ O	9 μL	9 \times 1.1N

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

二、提取法

1. 待测样本的准备：用支原体DNA提取试剂盒提取待测的细胞培养液。（建议最后用20~30 μL 的洗脱液洗脱DNA）。
2. 反应体系的配制：将试剂盒从冰箱取出，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40 μL 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	39 μL	39 \times 1.1N
Mycoplasma Detector Enzyme	1 μL	1 \times 1.1N

3. 加样：在一只分装后的PCR管中加入10 μL 无模板水作为阴性对照，在另一只分装后的PCR管中加入1 μL Positive Control和9 μL 无模板水作为阳性对照，其余的荧光PCR管均加入10 μL 提取好的DNA作为检测孔。

三、上机反应

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

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

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

四、结果判定

本产品的支原体检测结果参考FAM荧光曲线的Ct值。VIC荧光曲线为内标曲线。实验结束后，按下列步骤分析和判断：

1. 阳性对照：FAM和VIC通道应均有扩增曲线，FAM通道Ct值 ≤ 32 ，VIC通道Ct值 ≤ 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值 ≤ 34 。
3. 样本的检测结果判断：当满足上述阳性对照和阴性对照的检测结果后看样本检测孔FAM的Ct值。当FAM的荧光曲线Ct值 ≤ 36 时为阳性结果。当FAM的荧光曲线Ct值 > 36 且内标VIC的Ct值 ≤ 34 时为阴性结果。

注意：当样本检测孔FAM的荧光曲线扩增Ct值较小时VIC荧光曲线可以不起峰，此时样本为阳性。