

Code No. CY232

研究用

TAKARA

CycleavePCR™
Mycoplasma Detection Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒外所需器材	2
● 使用前的注意事项	2
● 操作注意事项	2
● 操作流程	2
● 实验例	7
● 附 录	8
● 补充：关于区域划分	9
● 关联产品	10

● 制品说明

本制品以支原体 (*Mycoplasma*) 的 16S rRNA 为目的基因, 利用 Real Time PCR 仪对支原体进行高通量、特异性检出的试剂盒。使用本制品能高感度地检测出培养细胞中至少 10 种支原体 (*M. arginini*, *M. hominis*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. bovis*, *M. arthritidis*, *M. pirum*, *M. pneumoniae*) 以及 *Acholeplasma* 属中的 1 种 (*A. laidlawii*)。

本制品使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq HS*, 可以有效地抑制在配制反应液时发生的引物错配及引物二聚体引起的非特异性 PCR 扩增, 大大提高 PCR 的检测灵敏度。

本制品采用 Cycling Probe 法进行检测。Cycling Probe 法是由 RNA 和 DNA 构成的杂合探针与 RNase H 组合使用的高灵敏度检出法, 能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe 内部含有 RNA 碱基, 一端标记荧光物质, 另一端标记荧光淬灭物质, 当探针处于完整状态时, 由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光, 但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后, RNase H 在 RNA 部分将探针切断, 淬灭抑制作用解除, 荧光物质发出荧光 (参考图 1)。通过测定荧光强度, 能够实时监控扩增产物量。如果探针的 RNA 部分与模板不匹配, RNase H 就不能在 RNA 部分将探针切断。试剂盒中使用的探针是与支原体 16S rRNA 碱基互补的 RNA, 故可针对支原体进行高灵敏度的特异性检出。(序列信息请参考: 附录-表 1)

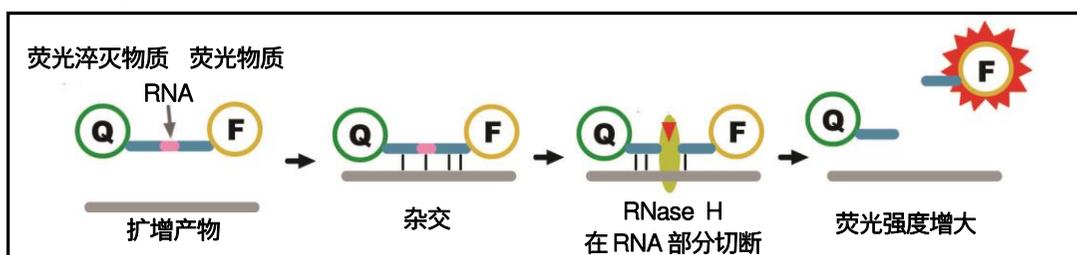


图 1. Cycling Probe 法技术原理图

● 制品内容 (25 μ l \times 50 次量)

1. 2X CycleavePCR Reaction Mix	625 μ l
2. Myco. Primer/Probe Mix (5X conc.)	250 μ l ^{*1}
3. RNase Free dH ₂ O	1 ml
4. Myco. Positive Control (1 x 10 ⁶ copies/ μ l)	20 μ l ^{*2}
5. Proteinase K	50 μ l

*1: 含荧光标记探针, 应避光保存。

*2: 如果不慎混入实时 PCR 组分 (1 ~ 3) 中, 会影响 PCR 反应的准确性。建议同其他组分分开保存, 以防止污染。

【制品组分说明】

2X CycleavePCR Reaction Mix: PCR反应试剂。含有反应所需的酶、Buffer、dNTP Mixture。

Myco. Primer/Probe Mix: 引物探针溶液。通过引物扩增目的基因以及Myco. Positive Control, 目的基因检测探针用FAM进行标记, Myco. Positive Control检测探针用ROX标记。

目的序列: 16S rRNA基因序列。

RNase Free dH₂O: RNase Free的灭菌水。

Myco. Positive Control: 阳性对照。用于确认从检测样品中带入反应体系的培养基等物质是否会对PCR反应造成干扰。

以Myco. Positive Control为模板, 通过Myco. Primer扩增后的PCR产物中同时包含FAM标记探针检出区域和ROX标记检出区域, 因此, FAM标记的探针和ROX标记的探针均可检测到。(请参考附录: Myco.

Positive Control序列)

Proteinase K: 用于在从培养上清或细胞悬液中制备DNA时除去蛋白质。在98°C下孵育2分钟可使之失活。

● 保 存: -20°C

● 试剂盒外所需器材

- Real Time PCR 仪以及专用 tube
Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900/TP960, 已终卖)
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760, 已终卖)
请使用 Thermal Cycler Dice Real Time System Software 进行分析。
注: 请咨询中国可以销售的仪器型号。
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等
- 200 μl、20 μl、10 μl 移液枪和配套枪头 (带有疏水滤膜)
- (桌面) 小型离心机

● 使用前的注意事项

- 由于本试剂盒是基因检测试剂盒, 不仅能够以活菌为检出对象, 同时也可以检测死菌。另外, 设计的 Probe/Primer 对于目的序列内发生基因变异、缺失/或插入时, 可能会出现无法检出的情况。(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。)
- 判断为阳性的样品, 要用微生物学方法进行再确认。

● 操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用请按照说明书进行。
2. 如果杂合探针、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. PCR 反应是灵敏度非常高的反应。为防止污染, 建议从反应液的配制到检测的实验过程中, 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、检出。
由于本产品使用 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。为了避免污染, 严禁从 Tube 管中取出扩增产物。

● 操作流程

1. 样品制备
使用 DNA 提取试剂盒从检测样品中提取 DNA。
2. Real Time PCR 仪的设定。
3. 反应液的配制及开始反应。
配制反应液
↓
将反应液分装到 microtube 中, 添加阴性对照、检测样品或阳性对照。
↓
将 microtube 放入 Real Time PCR 仪中, 开始反应。
4. 结果判定。

Real Time PCR 扩增曲线



反应完成



结果判定

A. 样品的制备（在区域2进行）

请使用继代后连续培养3~6天的培养细胞，并按照下述任一方法制备支原体检测用的样品。在进行定期污染调查等常规检查的取样时，建议使用培养上清或细胞悬液的Proteinase K处理检测样品。（其与直接使用培养上清时的检测灵敏度比较请参考：实验例）。

如果样品中含有PCR反应的阻害物质，支原体检测可能无法正确进行。为了确认是否含有干扰物质，请向样品（2.5 μl）中加入Myco. Positive Control（1 μl）进行Control实验，并通过ROX通道确认是否能够检出。如果通过ROX通道无法检出，那么请使用DNA提取试剂盒提纯DNA或尝试其他制备方法去除阻害物质。

【培养上清或细胞悬液经过Proteinase K处理后作为检测样品的操作流程】

[使用培养上清制备检测样品]

- 1) 取25 μl - 100 μl的培养上清加入到0.2 ml microtube中。
- 2) 每100 μl培养上清加入1 μl Proteinase K。
(向25 μl培养上清中加入1 μl Proteinase K的比例也可以)
- 3) 在PCR仪中，55℃孵育15分钟。
- 4) 98℃孵育2分钟使酶失活，检测样品制备完成。

[使用细胞悬液制备检测样品]

- 1) 用细胞刮刀将烧瓶或培养皿上的细胞刮至培养上清中，使其成为悬浮液。
- 2) 肉眼可见细胞结块的情况下应充分进行涡旋振荡。
- 3) 每100 μl细胞悬液加入1 μl Proteinase K。
(向25 μl细胞悬液中加入1 μl Proteinase K的比例也可以)
- 4) 在PCR仪中55℃孵育15分钟。
- 5) 98℃孵育2分钟使酶失活，检测样品制备完成。

【直接将培养上清作为检测样品的操作流程】

在使用Eagle等常规的培养细胞培养基的情况下，可以对培养上清进行取样，将其直接作为检测样品。此时，添加的培养上清量应不超过反应体系的1/10。

【用苯酚 / 氯仿 / 异戊醇 (PCI) 提取培养上清并将其作为检测样品的操作流程】

使用这个方法，可以通过乙醇沉淀进行浓缩，增加添加到反应体系中的DNA量，提高灵敏度。

注：根据细胞种类和培养基的不同，避免存在PCR抑制物干扰PCR反应，因此建议进行前面提到的Control实验。

- 1) 将600 μl培养上清移入1.5 ml microtube中。
- 2) 加入600 μl TE饱和酚，并混合均匀。
- 3) 15,000 × g，室温下离心5分钟。
- 4) 将500 μl上清液移入新的1.5 ml microtube中。
- 5) 加入550 μl氯仿：异戊醇（24：1）混合均匀。
- 6) 15,000 × g，室温下离心5分钟。
- 7) 将500 μl上清液移入新的1.5 ml microtube中。
- 8) 加入500 μl氯仿：异戊醇（24：1）混合均匀。
- 9) 15,000 × g，室温下离心5分钟。
- 10) 将400 μl上清液移入新的1.5 ml microtube中。

- 11) 加入12 μl 3 M醋酸钠 (pH5.2)。(也可加入共沉剂)。
- 12) 加入1 ml乙醇混合均匀,并在 -20°C 下放置1小时。
- 13) 15,000 $\times g$, 4°C 下离心10分钟。
- 14) 除去上清,加入500 μl 的70%乙醇。
- 15) 15,000 $\times g$, 4°C 下离心10分钟。
- 16) 完全除去上清并自然干燥。
- 17) 将沉淀溶解到30 μl 灭菌水中,检测样品制备完成。

B. 配制反应液与开始反应

- 1) 在冰上配制如下反应液。(在区域1进行)

将模板以外的组分按所需数量 + α 的量进行配制,向各microtube中分别加入22.5 μl 反应混合液,轻轻盖上盖子。其中一支用作阴性对照,加入2.5 μl 灭菌水,盖紧盖。

所需数量设置为样品数 + 2支(用作阴性对照加入灭菌水的1支以及进行阳性对照反应的1支)。

试剂	使用量	终浓度
2X CycleavePCR Reaction Mix	12.5 μl	1 X
Myco. Primer/Probe Mix (5X conc.)	5 μl	1 X
检测样品or阳性对照*1or灭菌水	(2.5 μl)*2	
RNase Free dH2O	5 μl	
Total	25 μl	

*1: 阳性对照反应需使用1 μl Myco. Positive Control,再加入1.5 μl 灭菌水,总体积25 μl 。

*2: 检测样品或阳性对照将在步骤2)中进行添加。

[注意] 不要直接用手触摸microtube表面,请佩戴手套操作,以免影响荧光信号的收集。

(转移到区域3)

- 2) 样品(模板)的添加(在区域3进行)。

向除阴性对照之外的各管中加入样品或阳性对照,盖紧盖。

将microtube用桌面离心机进行轻微的离心,然后将其放置到Real Time PCR仪中。

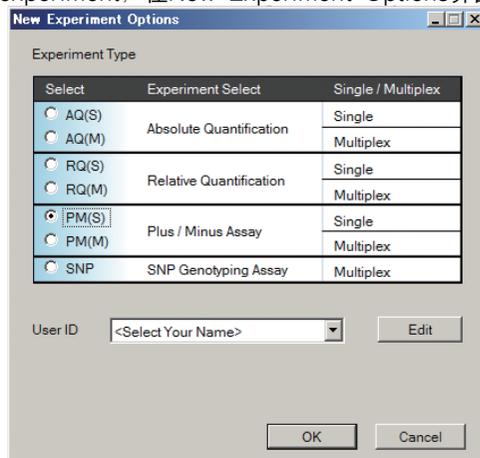
[注意] 配制反应液之后,请尽量在1小时以内开始反应。

C. 使用Real Time PCR仪进行反应和结果判定

使用的Real Time PCR仪不同,操作步骤也不同。详细的操作方法请参考各仪器附带的使用说明书。这里介绍使用Thermal Cycler Dice Real Time System // (已终卖)时的简单操作方法和结果判定。

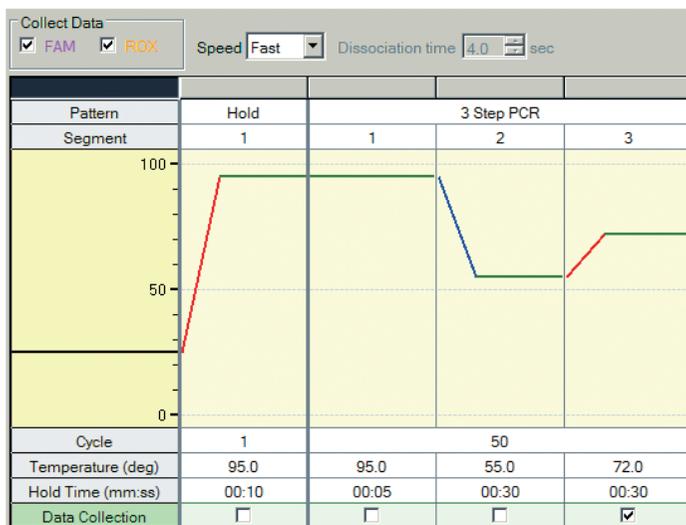
【Thermal Cycler Dice Real Time System // 的操作流程】

- 1) 创建New experiment,在New Experiment Options界面中选择PM (S) Plus/Minus Assay。



2) 在Thermal Profile Setup界面中对PCR反应条件进行如下设置。

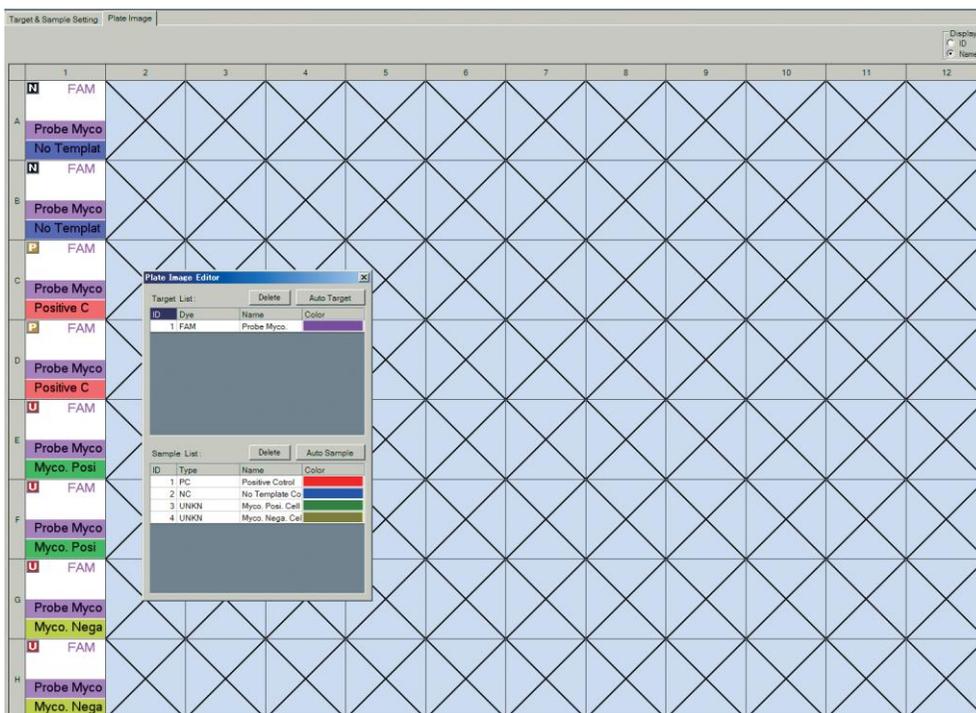
预变性 (Hold)
 Cycle: 1
 95°C 10 sec
 3 Step PCR
 Cycle: 50
 95°C 5 sec
 55°C 30 sec
 72°C 30 sec (检测)



3) 点击界面右下方的“Start Run”按键，开始反应。

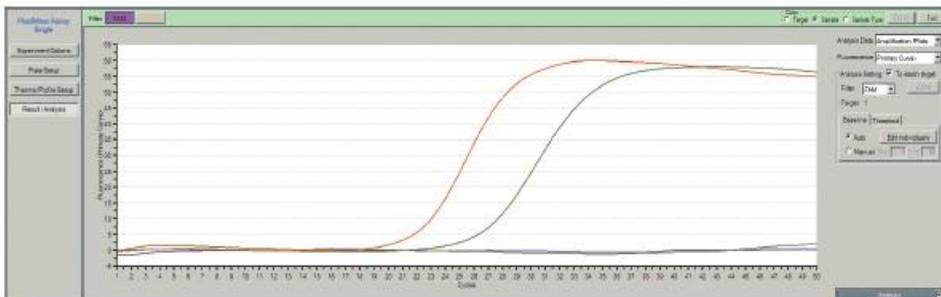


4) 在Plate Setup界面中设置孔信息。将不用于反应的孔设置为Omit。



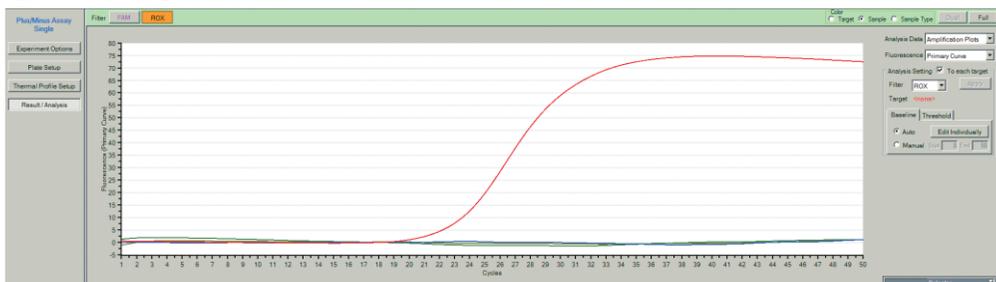
5) 反应结束后，在Result/Analysis界面中确认结果。

< 结果分析 >



确认阳性对照和阴性对照的扩增曲线。经确认，阳性对照的反应孔（红色）出现了扩增曲线的上升，阴性对照的反应孔（深蓝色）未出现扩增曲线的上升。

选择ROX，显示扩增曲线



确认阳性对照和阴性对照的扩增曲线。经确认，阳性对照的反应孔（红色）出现了扩增曲线的上升，阴性对照（深蓝色）的反应孔未出现扩增曲线的上升。

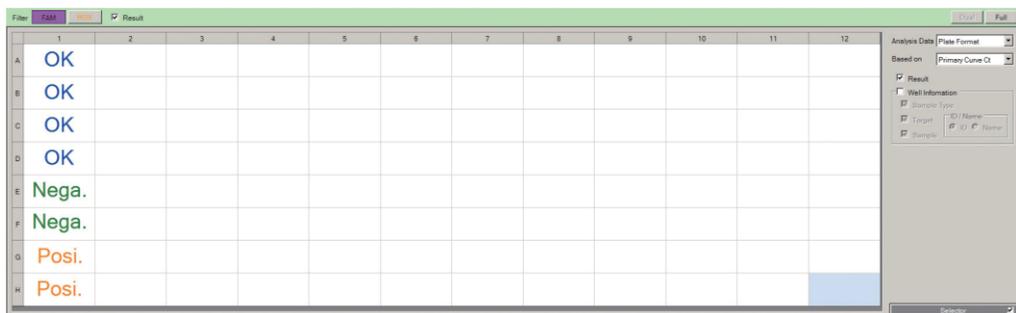
经确认，检测样品对应的反应孔也未出现扩增曲线的上升。

6) 从Analysis Data的下拉菜单中选择Plate Format，然后设置Result的选择框，显示判定结果。

Well	Sample Type	Result
A1	NC	
A2		-
B1		-
B2		-
C1	PC	+
C2		+
D1	PC	+
D2		+
E1	UNKN	+
E2		+
E3		+
F1	UNKN	-
F2		-
F3		-
G1	UNKN	-
G2		-
G3		-
H1	UNKN	-
H2		-
H3		-

Result的选择框为off时的画面

在右下方的Selector显示中显示为阴性对照<N>、阳性对照<P>、检测样品<U>。在反应孔显示中，阴性对照显示为<NC>，阳性对照显示为<PC>，检测样品显示为<UNKN>，检测出目的基因的反应孔显示为+，未检测出目的基因的反应孔显示为-。



Result的选择框设置为on的画面

OK: 对照反应正常 (表示反应正常运行中。)

OUT: 对照反应异常 (表示反应未能正常运行。)

检测样品<U>的显示

Posi.: 目的基因检测为阳性*

Nega.: 目的基因低于检出界限*

*: 根据是否超过阈值进行判定。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System的操作说明】

使用Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System时, 也可以在与Thermal Cycler Dice Real Time System //相同的PCR条件下使用。

请在Experiment Properties中选择Quantification-Standard, 并选择TaqMan Reagents或Others。(选择Others时, 请不要勾选Include Melt Curve。)

请在Plate Setup画面中将Target的Reporter设置为FAM, 将Quencher设置为NONE。

请将Plate Layout的Passive Reference设置为none。

● 实验例

方法:

在25 cm²的烧瓶中培养受到支原体污染的肾癌细胞。提取继代后第3天的一部分培养上清, 并用细胞刮刀将所有细胞刮至培养上清中, 将其作为细胞悬液检测样品进行提取。

在0.2 ml管中分别注入25 μl的培养上清和细胞悬液, 加入1 μl Proteinase K, 使用热循环仪在55°C下孵育15分钟, 然后在98°C下孵育2分钟, 得到Proteinase K处理检测样品。

取培养上清、细胞悬液及其相应的Proteinase K处理检测样品2.5 μl作为模板, 按照使用说明书中记载的方法进行了检测。

结果:

在使用培养上清的情况下, Proteinase K处理检测样品和未处理检测样品均能检出, 但Proteinase K处理检测样品的扩增曲线上升要比未处理检测样品快, 并且根据Ct值换算显示, Proteinase K处理后灵敏度提高了约11倍。

在使用细胞悬液的情况下, 非处理检测样品中未能检出, 但Proteinase K处理检测样品中不仅能够检出, 而且敏感度在所有检测样品中为最高。

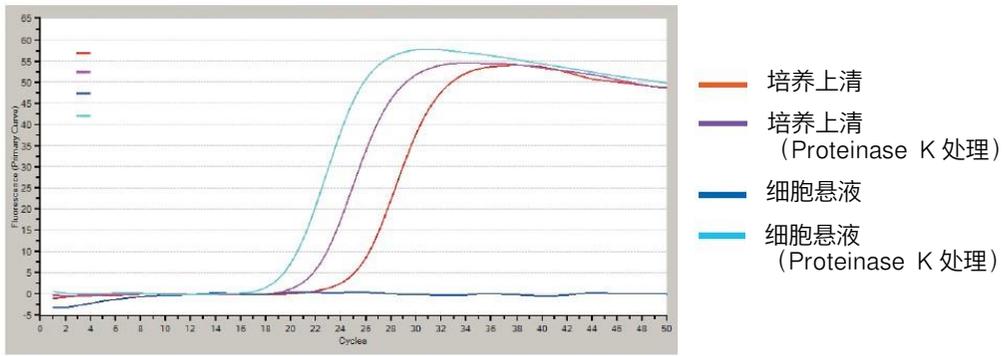


图 2. 取样方法和处理方法造成的检出结果差异

● 附录

Myc. Positive Control序列

本试剂盒中附带的Myc. Positive Control在pMD19-T simple的克隆位点中插入了以下序列。下述序列中的红字和箭头表示引物的位置和方向，粗体的大写字母表示Cycling Probe的识别位点，序列中的蓝字表示RNA。

```

aaaatggggg tgcggaacattagttagttgg tagggtaatggcctaccaagacgatgatgtttagccg
ggccgagaggctgtacggccacactgggactgagatacggcccagactcctacgggaggcagcagtaa
ggaat t t t c c a a a t g a g c g a a a g c t t g a t g g a g c g a c a c a g c g t g c a g g a t g a a g t t c t t c g g a a t g
taaactgctgttataaggggaaggcggccgctaagggc t t t c a AAGACTGGTTCCgggtccttattagaa
                                     Positive Control 识别序列 (*1)
agcgacggcaaactatgtgccagcagcccgc GGTAATACATAGGtcgcagcgttattccggaattatt
                                     支原体识别序列 (*2)
gggcgtaaagcgtcctaggtttt g c t a a a g t c t g g a g t t a a a t g c t g a a g c t c a a c t t c a g t c c g c t
ttggatactggcaaaatagaattataaagaggttagcgggaattcctagtgaaagcgggtgggaatgcgta
gatattaggaaggacaccaatagggcgaaggcagctaactggttatatattgacactaagggacgaaa
gcgtgggggagcaaacaggattagata ccctggttaggccacgccgtaaacgatgatcat

```

* 1: 通过ROX标记探针检出

* 2: 通过FAM标记探针检出

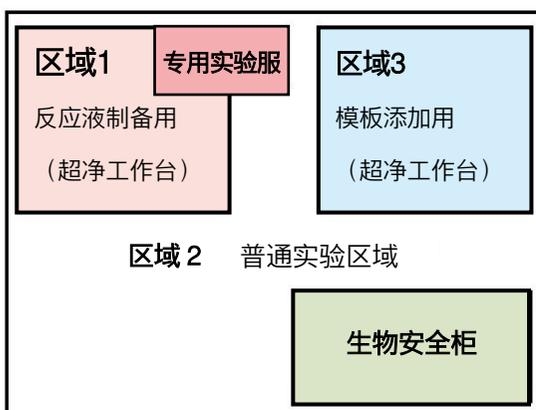
引物及探针的设计

本试剂盒中附带的Myc. Primer/Probe Mix所含引物及探针的序列以及主要的支原体 (*Mycoplasma* spp.)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和一些常见菌种的序列如下所示。红字表示引物或探针序列与基因组序列之间存在的错配，灰字表示一致的部分。

表 1. 引物和探针的序列以及与之相对应的各种细菌的DNA序列

	上游引物 (混合型)	探针	下游引物
	TGCGGAACATTAGTTAGTTGG TGCGGCATATCAGCTAGTTGG	GGTAATACaTAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. arginini</i>	TGCGGAACATTAGTTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. hominis</i>	TGCGGAACATTAGTTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. hyorhinis</i>	TGCGGAACATTAGTTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. orale</i>	TGCGGAACATTAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. salivarium</i>	TGCGGAACATTAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. fermentas</i>	TGCGTAACATTAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. bovis</i>	TGCGCAACATTAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTAAGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. arthritis</i>	TGCGGAACATTAGCTTGTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>M. pirum</i>	TGCGGCATATCAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGGTGGACTACTAGGG
<i>M. pneumoniae</i>	TGCGCCATATCAGCTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGGTGGACTACTAGGG
<i>A. laidlawii</i>	TGCGGCGCATTAGTTAGTTGG	GGTAATACATAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>B. subtilis</i>	CGCGGCGCATTAGTTAGTTGG	GGTAATACGTAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>E. coli</i>	CAGATGGGATTAGCTAGTAGG	GGTAATACGGAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CGCGGCGCATTAGCTAGTTGG	GGTAATACGTAGG	TTTACGGCATGGACTACCAGGG
<i>Propionibacterium acnes</i>	TCGCGGCTTATCAGCTTGTGG	GGTGATACGTAGG	TTTACAGCGTGGACTACCAGGG
<i>Actinomyces naeslundii</i>	TCGCGGCCTATCAGCTTGTGG	GGTAATACGTAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>Staphylococcus aureus</i>	CGCGCTGCATTAGCTAGTTGG	GGTAATACGTAGG	TTTACGGCGTGGACTACCAGGG
<i>Clostridium difficile</i>	CGCGTCTGATTAGCTAGTTGG	GGTAATACGTAGG	TTTACAGCGTGGACTACCAGGG

● 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。
标准样品的稀释也在此进行。

● 关联产品

TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set (Code No. 6601)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)
96well Hi-Plate for Real Time (Code No. NJ400)
Sealing Film for Real Time (Code No. NJ500)
Plate Sealing Pads (Code No. 9090)
48 well snap plate (Code No. NJ700)
Flat cap for snap plate (Code No. NJ720)
Mycoplasma-EX (Code No. PK-CC91-4003)
BIOMYC-1 (Code No. PK-CC03-036-1D/PK-CC03-036-1C/PK-CC03-036-1B)
BIOMYC-2 (Code No. PK-CC03-037-1D/PK-CC03-037-1C/PK-CC03-037-1B)
BIOMYC-3 (Code No. PK-CC03-038-1D/PK-CC03-038-1C/PK-CC03-038-1B)
Mycoplasma-ExS Spray (Code No. PK-CC91-5051)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

CycleavePCR and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

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>