

*MycoSHENTEK*<sup>®</sup>

**支原体 DNA 检测试剂盒**  
**(PCR-荧光探针法)**  
**说明书**

货号：SK0802MY50

版本：B/0

仅供研究用

湖州申科生物技术有限公司

## ■ 试剂盒简介

MycoSHENTEK® 支原体 DNA 检测试剂盒用于定性检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批以及临床治疗用细胞中是否有支原体、螺原体污染。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术,定性检测样品中支原体、螺原体 DNA,涵盖了 120 多种支原体和螺原体 DNA 序列;检测快速,专一性强,性能可靠,参照 EP 2.6.7 和 JP XVII 支原体检测相关要求进行了验证。

内部质控 (IC) 可在 PCR 扩增反应阶段加入,以判断待检样品对扩增反应是否存在抑制,防止假阴性结果的产生;也可在样品提取阶段加入,以评估提取效果。

本试剂盒与 MycoSHENTEK® 支原体 DNA 提取纯化试剂盒配套使用,高效提取样品中的支原体 DNA,检测限可达到 10 CFU/ml。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	装量	储存条件
MyqPCR Reaction Buffer	400µl×1 管	-18°C及以下,避光
MyPrimer&Probe MIX	75µl×1 管	-18°C及以下,避光
内部质控 (IC)	600µl×1 管	-18°C及以下
阳性质控 (PC) *	500µl×1 管	-18°C及以下
DNA 稀释液	1.5ml×1 管	-18°C及以下

\* 阳性质控 (PC) 浓度为 1000 copies/µl。

## ■ 规格

50 Reactions。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月。

## ■ 适用机型

➤ 7500 Real-Time PCR System

➤CFX96 定量 PCR 系统

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

➤1.5ml 无菌低吸附离心管

➤96 孔 qPCR 板

➤1000μl, 100μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头

## ■ 相关设备

➤荧光定量 PCR 仪

➤1000μl, 100μl, 10μl 移液枪

## ■ 操作

### ❖ qPCR 反应液的准备

1. 根据所要检测样品的数量, 计算所需反应孔数, 一般做 2 个重复孔。

反应孔数 = (1 个阳性质控 PC + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性质控样品 NCS + N 个待测样品) × 2

2. 根据反应孔数计算所需的 MIX 总量:

MIX = (反应孔数 + 2) × 10μl (含有 2 孔的损失量)

3. 各试剂放在冰上融化, 并根据表 2 所示准备 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
MyqPCR Reaction Buffer	8μl
MyPrimer&Probe MIX	1.5μl
IC	0.5μl
总体积	10μl

\* 若样品提取时已加入 IC, 则配制 MIX 时应根据表 2 使用等体积的 DNA 稀释液代替 IC。

## ❖ 加样

1. 将所有溶液在冰上溶解, 轻微振荡混匀后根据表 3 所示加样, 排版方式可参考表 4:

表 3.各反应孔加样示例

阳性质控 PC	10 $\mu$ l qPCR MIX + 20 $\mu$ l 阳性质控
无模板对照 NTC	10 $\mu$ l qPCR MIX + 20 $\mu$ l DNA 稀释液
阴性质控样品 NCS	10 $\mu$ l qPCR MIX + 20 $\mu$ l NCS 纯化液
待测样品	10 $\mu$ l qPCR MIX + 20 $\mu$ l 待测样品纯化液

\* 加样完成后体积为 30 $\mu$ l /孔。

表 4.96 孔板排版示例

PC	PC				S1	S1						A
					S2	S2						B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
NTC	NTC				S8	S8				NCS	NCS	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

\* 该示例表示的是检测 1 个阳性质控 PC、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控样品 NCS、8 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。

\* 实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10s 后放入 qPCR 仪。

## ❖ qPCR 程序参数设置

1. 创建 FAM 探针, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 创建 VIC 探针, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none; 选择检测参比荧光为 ROX (可选择)。

2. 设置反应程序: 95°C预变性 10min; 95°C 15 s, 62°C 30 s, 72°C 1 min 30 s (读取荧光), 45 个循环; 反应体积 30 $\mu$ l。

### ❖ qPCR 结果分析

\* 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 选择 Manual Ct, 将 Threshold 设置为 0.02, 选择 Auto Baseline, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阳性质控 PC 孔、阴性质控样品 NCS 孔、待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 PC、NTC、NCS、S1~S8, 之后点击 。

\* 阈值线设定应基于实验室验证数据, 可从满足检测限要求考虑。

\* 结果分析参数的设置需依据具体的机型及使用的软件版本, 也可选择仪器自动判读。

\* CFX96 定量 PCR 仪, 软件版本 CFX Manager 2.0, 阈值线可设置为 300。

3. PC、NTC、NCS 检测结果应为:

表 5.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
PC	<40 且有效的“S”型扩增	<40 且有效的“S”型扩增
NTC	Ct $\geq$ 40 或扩增曲线无明显起峰	<40 且有效的“S”型扩增
NCS	Ct $\geq$ 40 或扩增曲线无明显起峰	<40 且有效的“S”型扩增

\*质控标准应基于实验室验证数据, 可从满足检测限要求考虑。

## 4. 待测样品检测结果判定:

表 6.待测样品检测结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
Ct<40 且有效的“S”型扩增	<40 且有效的“S”型扩增	阳性
	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制
Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	Ct<40 且有效的“S”型扩增	阴性
	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制

\* VIC 信号如果有抑制, 需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。

- ❖ 如遇特殊样品或其他异常现象, 结果难以判定, 可联系湖州申科, 咨询具体解决方案。

---

## 服务支持



湖州申科生物技术有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话: 0572-2165910