

支原体 DNA 检测试剂盒（2G）
（PCR-荧光探针法）
说明书

货号：1509841

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

MycoSHENTEK®支原体 DNA 检测试剂盒 (2G) 与 MycoSHENTEK®支原体 DNA 提取纯化试剂盒 (2G) 配套使用, 定性检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批以及细胞制品中是否有支原体、螺原体、无胆甾原体污染, 参照 EP 2.6.7 和 JP XVIII 支原体检测相关要求验证, 检测限为 10 CFU/mL。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术, 可定性检测约 200 种支原体、螺原体、无胆甾原体 DNA; 经过多种支原体、非支原体和常见工程细胞 DNA 检测, 特异性强; 本试剂盒含 dUTP, 可使用 UNG 酶系统以预防污染, 有效避免假阳性结果的出现。

内部质控 (IC) (2G) 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。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
内部质控 (IC) (2G) *	NNA035	冻干粉×1 管	-18°C及以下
阳性质控 (PC) (2G) *	NNA039	冻干粉×1 管	-18°C及以下
MyqPCR Reaction Buffer (2G)	NNB004	400 μL×1 管	-18°C及以下, 避光
MyPrimer&Probe MIX (2G)	NNC065	75 μL×1 管	-18°C及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL×2 管	-18°C及以下

* 内部质控 (IC) (2G)、阳性质控 (PC) (2G) 分别使用 600 μL、500 μL DNA 稀释液复溶。

■ 规格

50 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型 (包括但不限于以下机型, 使用前需验证检测灵敏度)

➤ SHENTEK-96S

➤ 7500 Real-Time PCR System

- CFX96 定量 PCR 系统
- Roche LightCycler 480 II

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 八联管或 96 孔 qPCR 板
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 75%酒精
- UNG 酶 (确定使用前建议验证酶效果)
- 支原体阳性对照品

■ 相关设备

- 超净台或生物安全柜
- 迷你离心机
- PCR 管振荡混合仪
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程

❖ 实验前的准备

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟, 喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下区域转移至 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 区域或冰上融化, 涡旋振荡混匀并瞬时离心。

❖ 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 + 1 个阳性质控样品 (PCS) + N 个待测样品) \times 2

2. 根据反应孔数计算所需的 MIX 总量:

$$\text{MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 10 \mu\text{L} \text{ (含有 2 孔的损失量)}$$

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 (2G)	8 μL
MyPrimer&Probe MIX (2G)	1.5 μL
内部质控 (IC) (2G) *	0.5 μL
总体积	10 μL
UNG 酶	0.1 U

* 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. 将所有溶液放置在 2~8°C 区域或冰上融化, 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 μL qPCR MIX + 20 μL 阳性质控
无模板对照 NTC	10 μL qPCR MIX + 20 μL DNA 稀释液
阴性质控样品 NCS	10 μL qPCR MIX + 20 μL NCS 纯化液
阳性质控样品 PCS	10 μL qPCR MIX + 20 μL PCS 纯化液
待测样品	10 μL qPCR MIX + 20 μL 待测样品纯化液

* 加样完成后体积为 30 μL /孔。

表 4.96 孔板排版示例

NTC	NTC				S1	S1				NCS	NCS	A
					S2	S2						B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
PC	PC				S8	S8				PCS	PCS	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、1 个阳性对照样品 PCS、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. 将八联管用配套管盖盖紧或 96 孔版用光学膜封闭，置于 PCR 管振荡混合仪中振荡混匀，短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

❖ qPCR 程序参数设置

◇ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1：选择反应孔。
3. 选择步骤 2：选择项目中的“支原体检测-2G”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ 其他定量 PCR 系统程序设置如下：


1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针，命名为“支原体检测-2G”，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，检测参比荧光为 ROX（可选）。

3. 设置三步法反应程序：**25°C UNG 酶作用 10 min；95°C 预变性 10 min；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 μL。**

❖ qPCR 结果分析


✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照, PC 孔设置为阳性对照, NCS 孔设置为阴性对照, 待测样品孔设置为待测样品。


2. 在“实验分析”页面点击 , 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。

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

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 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, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PCS 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、PCS, 之后点击 。

3. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、PCS 的检测值。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

❖ 判定标准

1. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果应为:

表 5.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
NTC	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 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。

2. 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
2 复孔有 1 孔以上 Ct<40 且有效的“S”型 扩增	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阳性, 有抑制
2 复孔 Ct≥40 或扩增曲 线无明显起峰	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断, 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。

修订日期: 2023 年 01 月 16 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910