



# 支原体 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) (快速版) 说明书

版本: A/1

英文名称: Mycoplasma DNA FastDetect Kit

货号: 1509101 规格: 100 Reactions

所述产品仅供研究使用, 不得用于诊断及治疗目的。



在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

## 第一章 产品信息

### 1.1 产品描述

MycoSHENTEK®支原体 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）（快速版）与 MycoSHENTEK®支原体 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）（快速版）配套使用（<https://www.shenkebio.com>），定性检测原辅料、主细胞库、工作细胞库等细胞培养物以及生产工艺过程中各类基质样品下是否有支原体、螺原体、无胆甾原体、虫原体及中间原体污染，检测限可达 10 CFU/mL。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术，可快速定性检测约 200 种支原体、螺原体、无胆甾原体、虫原体及中间原体 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。

Fast MyInternal Control (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。本试剂盒特别提供两种 Fast MyPrimer&Probe MIX，其内参（IC）探针分别采用 ROX 和 VIC 两种荧光标记，用户可根据所使用的定量 PCR 仪型号灵活选择。

### 1.2 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件	备注
Fast MyInternal Control (IC) <sup>[1]</sup>	NNA071	2 管	-18 °C及以下	/
Fast MyPositive Control (PC) <sup>[1]</sup>	NNA072	2 管		/
Fast MyqPCR Reaction Buffer	NNB025	2 × 425 μL	-18 °C及以下， 避光	/
Fast MyPrimer&Probe MIX	NNC135	2 × 75 μL		内参（IC）探针采用 ROX 荧光标记
Fast MyPrimer&Probe MIX-1	NNC148	2 × 75 μL		内参（IC）探针采用 VIC 荧光标记
DNA 稀释液	NND001	2 × 1.5 mL	-18 °C及以下	/

<sup>[1]</sup> IC、PC 为冻干粉，分别使用 600 μL、500 μL DNA 稀释液复溶

### 1.3 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

### 1.4 实验所需设备/材料

表 2. 实验所需设备/材料

适配机型（包括但不限于）	SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统（货号：1610860）
	ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统
	LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 系统
设备	超净工作台或生物安全柜
	迷你离心机
	微孔板离心机
	涡旋振荡器
	荧光定量 PCR 仪
	移液器
耗材	1.5 mL 低吸附离心管（货号：1901100）
	PCR 8 联管（货号：1903100）或 96 孔板
	低吸附滤芯枪头（货号：1901980-10/100/1000）
试剂	75%酒精
	UNG 酶（确定使用前建议验证酶效果）

# 快速操作实验流程

## 01 实验前准备

- Fast MyInternal Control (IC)
- Fast MyPrimer&Probe MIX
- Fast MyPositive Control (PC)
- Fast MyPrimer&Probe MIX-1
- Fast MyqPCR Reaction Buffer
- DNA稀释液(DNA Dilution Buffer)



涡旋振荡



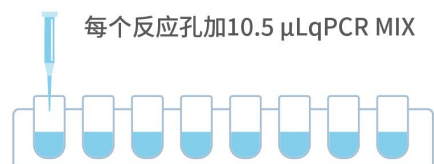
瞬时离心3~5 秒

## 02 qPCR预混液配制

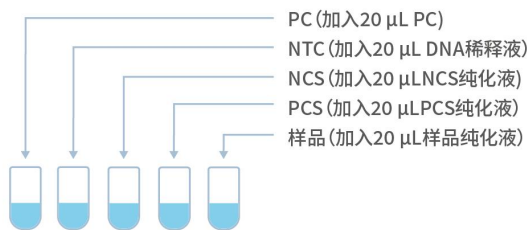


### qPCR MIX配制

- 检测样品单孔用量为例  
加入8.5  $\mu\text{L}$  Fast MyqPCR Reaction Buffer  
加入1.5  $\mu\text{L}$  Fast MyPrimer&Probe MIX\*  
加入0.5  $\mu\text{L}$  Fast MyInternal Control (IC)  
加入0.1 U UNG 酶\*
- 提取样品单孔用量为例  
加入8.5  $\mu\text{L}$  Fast MyqPCR Reaction Buffer  
加入1.5  $\mu\text{L}$  Fast MyPrimer&Probe MIX\*  
加入0.5  $\mu\text{L}$  DNA稀释液  
加入0.1 U UNG 酶\*



## 03 加样

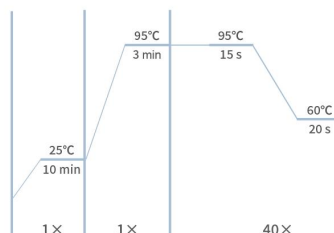


盖紧管盖或封好封板膜  
置于振荡混合仪中振荡混匀



离心10 秒

## 04 qPCR程序设置与运行



## 第二章 试剂盒使用

### 2.1 实验前准备

1. 穿戴无污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液器及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒转移至 2-8 °C 区域或冰上融化。

### 2.2 qPCR 预混液配制及加样

1. 反应孔数计算：根据样品和对照样品的数量，计算检测所需反应孔数，一般做 2 个重复孔/样。（建议根据反应孔数增加 10%的损耗量）
2. 预混液（qPCR MIX）配制：待各组分完全融化后，充分混匀试剂并短暂离心，按照下表所示的试剂和体积，制备 qPCR MIX，并充分混匀，短暂离心。

表 3. qPCR MIX 配制

组分	检测样品单孔用量	提取样品单孔用量
Fast MyqPCR Reaction Buffer	8.5 μL	8.5 μL
Fast MyPrimer&Probe MIX <sup>[1]</sup>	1.5 μL	1.5 μL
Fast MyInternal Control (IC)	0.5 μL	/ <sup>[2]</sup>
DNA 稀释液	/	0.5 μL
总体积	10.5 μL	10.5 μL
UNG 酶 <sup>[3]</sup>	0.1 U	0.1 U

<sup>[1]</sup> 根据所使用的定量 PCR 仪型号选择 Fast MyPrimer&Probe MIX（IC 探针为 ROX 标记）或 Fast MyPrimer&Probe MIX-1（IC 探针为 VIC 标记）。

<sup>[2]</sup> 样品提取时已加入 IC，则配制 qPCR MIX 时添加等体积的 DNA 稀释液。

<sup>[3]</sup> 建议添加 UNG 酶降低气溶胶污染风险，使用前建议验证酶用量及效果。

3. 反应体系加样：将 qPCR MIX 按照排版进行分液，将 NTC、样品、质控样品加入 96 孔板的相应位置，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。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	●	●	○	○	○	●	●	○	○	○	●	●	● NTC
B	●	●	○	○	○	●	●	○	○	○	●	●	● NCS
C	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	● S1-S8
D	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	● PC
E	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	● PCS
F	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	

- ① 向每个反应孔中加入 10.5  $\mu$ L qPCR MIX;
- ② 向相应孔中加入依次加入 20  $\mu$ L DNA 稀释液 (NTC)、NCS 纯化液 (NCS)、待测样品纯化液 (S1-S8)、Fast MyPositive Control (PC)、PCS 纯化液 (PCS)。

4. 盖紧管盖或封好封板膜，轻微振荡混匀，短时间快速离心 10 秒。

## 2.3 qPCR 仪器设置

**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“支原体快速检测”程序（对应荧光通道为 FAM 和 ROX）或“支原体快速检测-1”程序（对应荧光通道为 FAM 和 VIC）。
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“支原体快速检测”，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none；当选择 Fast MyPrimer&Probe MIX 时创建 ROX 探针，选择报告荧光基团为 ROX，猝灭荧光基团为 none，检测参比荧光为 none；当选择 Fast MyPrimer&Probe MIX-1 时创建 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。

### 3. 设置反应程序：

步骤	温度	时间(mm:sec)	循环数
UNG 酶 <sup>[1]</sup>	25 °C	10:00	1
预变性	95 °C	03:00	1
变性	95 °C	00:15	40
退火/延伸	60 °C <sup>[2]</sup>	00:20 <sup>[3]</sup>	

<sup>[1]</sup> 若 qPCR MIX 配制时未添加 UNG 酶，则该步省略。

<sup>[2]</sup> 仪器将在此步骤中读取荧光信号。

<sup>[3]</sup> 以 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统为例，若所使用 qPCR 仪器性能无法满足 60 °C 20 秒退火要求，可设置为 60 °C 30 秒及以上。

## 2.4 结果计算

### 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、PCS 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“分析”，在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品等检测值。


### 以 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统、软件版本 1.5.1 为例：

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，设置合适的阈值线，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

---

**备注：**当选择 *Fast MyPrimer&Probe MIX-1* (IC 探针为 VIC 标记) 时，FAM 和 VIC 的阈值线建议设置为 0.04，基线设置为自动。

---

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、PC 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、PC、PCS，完成后点击 。
3. Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品等检测值。

---

**备注：**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。

---

## 2.5 结果判断

### 1. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果参考表 4:

表 4.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	ROX 或 VIC 信号
NTC	2 复孔未检出或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<32 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔未检出或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<32 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<32 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<32 且有效的“S”型扩增

**备注:** 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参考表 5:

表 5.待测样品检测结果分析

FAM 信号	ROX 或 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<35 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct≥35 或扩增曲线无明显起峰	阳性, 有抑制
2 复孔未检出或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct≥35 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断, 有抑制

**备注:** 若阴性质控 Ct 值有检出但 Ct 值大于 10 CFU/mL 菌株 2 个循环及以上, 则可判定阴性质控符合要求。

阴阳性质控符合要求时, 若待测样品 Ct 值有检出但 Ct 值大于 10 CFU/mL 菌株 2 个循环及以上, 也可判定为阴性。

ROX 或 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: 2026 年 03 月 27 日

生效日期: 2026 年 04 月 10 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[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：400-878-2189