

## MycoHUABIO Mycoplasma qPCR Detection Kit

### 支原体DNA检测试剂盒

#### (qPCR法) 说明书

货号: K0105

#### ■ 产品介绍

MycoHUABIO 支原体 DNA qPCR 检测试剂盒按照 EP2.6.7 和 JPXVII 支原体检测相关标准进行验证, 可用于检测主细胞库、工作细胞库、临床治疗用细胞和生物制品中是否存在支原体污染。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术, 参照 EP2.6.7 和 JP XVII 支原体检测相关要求进行了验证, 检测快速, 在 2h 内可完成检测工作, 专一性强。

注: 本试剂盒仅用于研究, 不能用于临床诊断。

#### ■ 灵敏度和特异性

本试剂盒检测了 EP2.6.7 和 JP XVII 提到的 10 种支原体 10CFU 标准品 (MB 公司购买) 灵敏度, 均可达到 10CFU/ml, 另 EP2.6.7 和 JP XVII 中提到的 3 种支原体相关细菌检测结果均为阴性。符合 EP2.6.7 和 JP XVII 的相关灵敏度及特异性要求。

表 1. 10 种支原体标准品检测结果

菌株	阳性/总数	菌株	阳性/总数
口腔支原体	24/24	关节液支原体	24/24
鸡毒支原体	23/24	精氨酸支原体	24/24
莱氏无胆甾原体	24/24	猪鼻支原体	24/24
发酵支原体	23/24	柠檬螺原体	24/24
肺炎支原体	24/24	唾液支原体	24/24

结果表明: 支原体检测试剂盒检测各支原体标准品 10CFU/ml 浓度, 检出比均大于 95%, 符合欧洲及日本药典特异性及灵敏度要求。

表 2. 三种支原体密切相关细菌检测结果

细菌名称	嗜酸乳杆菌	肺炎链球菌	丙酮丁醇梭菌
检测结果	阴性	阴性	阴性

结果表明: 与支原体密切相关的 3 种细菌基因组检测结果为阴性, 符合欧洲及日本药典特异性要求。

#### ■ 稳定性

MycoHUABIO 支原体 DNA 检测试剂盒经过 5 次冻融测试, 试剂盒性能不受影响。

#### ■ 测试仪器

Roche LightCycler 480 II

## ■ 产品信息

表 3. 产品货号信息

产品名称	产品编号	规格
MycoHUABIO Mycoplasma qPCR Detection Kit MycoHUABIO支原体DNA检测试剂盒	K0105-25T	25T
	K0105-100T	100T

## ■ 试剂盒组分

表 4. 试剂盒组分

组分		产品编号/规格		包装
		K0105-25T	K0105-100T	
K0105-1	Buffer	375 $\mu$ l	2x 750 $\mu$ l	透明管绿色盖
K0105-2	引物/探针混合物	100 $\mu$ l	400 $\mu$ l	棕色管
K0105-3	内控	500 $\mu$ l	2 x 1 ml	透明管蓝色盖
K0105-4	阳性模板	250 $\mu$ l	1 ml	透明管红色盖
K0105-5	无菌水	500 $\mu$ l	2 x 1 ml	透明管

## ■ 储存方法及有效期

-20℃保存，有效期 24 个月。

## ■ 操作方法

### 1. 配制预混液

- 1.1 将各试剂于冰上融解，Buffer 试剂上下颠倒轻轻混匀后轻微离心，其他试剂涡旋混匀后轻微离心。
- 1.2 按照下列组分配制反应预混液：

表 5. 预混液配制表

试剂组分	单孔用量
Buffer	15 $\mu$ l
引物/探针混合物	4 $\mu$ l
内控	1 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

**注：**实验分为 1 个阳性组、1 个阴性组和 N 个实验组，每组应设 2 个重复，根据反应孔数计算所需的预混液总量。若实验组样品在 DNA 提取时（每个检测样品建议加入 20  $\mu$ l 内控）已加入内控，则配制反应预混液时应将内控替换为无菌水；DNA 提取时需设置阴性质控样品 NCS，即加入同等内控的无菌水，验证提取过程是否异常；提取的洗脱体积建议不超过 100  $\mu$ l，以保证 qPCR 反应的灵敏度。

### 2. 分装与加样

- 2.1 轻轻吹打混匀反应预混液，按 20  $\mu$ l 每孔分装到 qPCR 96 孔板中（阴性组排版时最好放在 A 行，并隔孔再加阳性组或实验组，降低污染的概率）；
- 2.2 按照下表分组，将对应的模板加入到反应孔底部（样品间注意更换枪头，避免污染）；
- 2.3 将 96 孔板用光学膜封板，轻微震荡混匀，快速离心后放入 qPCR 仪（避免徒手触摸光学膜）。

表 6.各反应孔加样示例

阴性组	10 μl 无菌水+20μl 预混液
阳性组	10 μl 阳性模板+20μl 预混液
实验组	10 μl 待测样品+20μl 预混液

### 3. qPCR 程序设置

3.1 选择双通道水解探针法程序(FAM 为支原体检测通道, HEX 为内控检测通道) 或根据不同仪器设置双通道检测, FAM 为支原体检测通道, HEX 为内控检测通道。

3.2 设置反应程序:

表 7.反应程序

阶段	预变性	变性	退火/延伸
温度	95°C	95°C	60°C
时间	2min	5s	35s
循环数	1	48	
检测	无	无	收集信号
反应体积	30 μl		

## ■ qPCR 结果分析

不同仪器分析方法不同, 分析后先查看下扩增曲线形态是否正常。分析后根据以下表格参考判断实验结果:

表 8.结果分析标准

	FAM 信号	HEX 信号	判定结果
阴性组	CT $\geq$ 40 或无“S”型扩增曲线	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	阴性
阳性组	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	阳性
实验组	CT $\geq$ 40 或无“S”型扩增曲线	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	阴性
		CT $\geq$ 40 或无“S”型扩增曲线	有抑制
	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	CT $<$ 40 且有“S”型扩增曲线	阳性
		CT $\geq$ 40 或无“S”型扩增曲线	有抑制

注: 如 HEX 信号有抑制, 建议对样品进行基因组提取后再检测。