



支原体快速检测试剂盒 (qPCR)

货号：OPA-S101

规格：25 Tests

重要提示：在进行实验之前请仔细阅读本手册。

本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。

【产品简介】

本试剂盒用于定性检测支原体 DNA。可检测细胞库、病毒种子批以及细胞与基因治疗制品、原辅料、其他生物制品的中间品及成品中支原体的污染。参照 EP2.6.7 和 JP XVIII 支原体 NAT 检测相关要求验证，全面符合或优于监管指南的要求标准 (10 CFU/mL)。

本试剂盒中包含支原体 DNA 检测的相关试剂，并不包含支原体 DNA 提取的相关试剂。在过程检和批放行的支原体检测，需要配合使用 Mycoplasma DNA Sample Preparation Kit (Magnetic Beads) (OPA-E101) 进行待测样品和对照样品的前处理。

本试剂盒是利用 TaqMan-qPCR 原理，特异的定性检测大于 250 种支原体、无胆甾原体及螺原体；且能避免非支原体菌株、常见工程细胞株和细胞培养基基质的干扰。本试剂盒 mix 中含有 UNG 酶，可有效避免扩增中的假阳性；含有内部质控，可在样品提取时加入，用于监测是否有效提取；也可在 PCR 阶段加入，用于监测扩增过程是否存在扩增抑制。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。
2. 试剂盒必须在有效期内使用。
3. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
4. 需严格按照说明书操作方法，全部使用本试剂盒配套试剂以保证最佳检测结果。
5. 建议将 PCR 体系配制、样品提取与 DNA 加样、PCR 扩增分区操作，并保证各实验区的清洁度，最大限度的避免交叉污染。
6. 扩增后产物不能开盖，防止产生气溶胶污染后续检出假阳性结果的风险。
7. 须使用带滤芯吸头；注意加样时更换吸头，小心操作和开关每个样品管，避免飞溅和喷洒，避免长时间开盖，最大限度避免交叉污染。
8. 最终试验结果与试剂的有效性，操作者的操作方法及试验环境密切相关。
9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样品消耗负责，请使用者使用前充分考虑样品的可能使用量，合理预留。

【试剂盒组分】

表 1. 试剂盒组分

组 分	管盖颜色	装量	储存条件
2×qPCR Master Mix		400 μL×1 管	-15 ~ -30°C备注： 2×qPCR Master Mix 和 Primer&Probe Mix 需避光保存。
<i>Myco</i> Primer&Probe Mix		100 μL×1 管	
阳性质控冻干品 (PC Powder)		1 管	
紫盖空管 (Purple-capped empty tube)		1 管	
内部质控 DNA (Internal Control DNA)		300 μL×1 管	
DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer)		1.5 mL×2 管	
无核酸酶水 (DNase/RNase-Free Water)		1.0 mL×1 管	

【有效期】

试剂盒保存于-15 ~ -30°C，试剂盒自生产之日起有效期为 18 个月，有效期见外包装箱标签。

【试验所需自备器材】

荧光定量 PCR 仪; 1.5 mL 无菌低吸附离心管; qPCR 专用无菌无酶八联管或 96 孔板; 1000 μL, 100 μL, 20 μL, 10 μL 移液器; 1000 μL, 100 μL, 20 μL, 10 μL 无菌低吸附带滤芯吸头。

【适配机型 (包括但不限于)】

ABI 7500/7500 Fast Real-Time PCR System, ABI QuantStudio® 5 实时荧光定量 PCR 仪; Roche Light Cycler 480 II, Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System; 博日 LineGene 9600 Plus 荧光定量 PCR 仪, 上海宏石 SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪。

【检测操作步骤】

1. 试剂准备

1.1 将试剂从冰箱取出，将试剂置于冰上融化，涡旋振荡混匀 20-30s 并瞬时离心。

1.2 阳性质控 DNA 准备：取出 PC Powder，按照管盖箭头指示打开管盖，加入 1.4mL DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer)，盖上管盖，振荡混匀 1 min，将液体全部转移至紫盖空管 (试剂盒已提供) 中，标记为阳性质控 DNA (Positive Control DNA)。

注意事项：溶解后的阳性质控 DNA 需在 -20℃ 条件下保存，可将其分装成小份进行保存，避免反复冻融。

2. 实验对照设计建议

为了更好的判读待测样品的结果，推荐实验中使用如下对照设计，其中 NEC 和 PEC 一并与待测样品使用 OPA-E101 进行样品制备。

表 2. 实验对照设计

对照	样品类型	设置目的	PCR 重复孔数
阳性扩增质控 (Positive Amplification Control, PAC)	阳性质控 DNA (Positive Control DNA)	监控扩增有效性	3
无模板对照 (No Template Control, NTC)	无核酸酶水 (不含 DNA)	监控 qPCR 加样和扩增是 否存在污染	3
阴性提取对照 (Negative Extraction Control, NEC)	提取纯化液 (样品稀释液或 对应检测样品所用细胞基质)	监控提取过程 (提取试 剂、仪器、工作区域以及 操作流程) 是否存在污染	3
阳性提取对照 PEC (Positive Extraction Control, PEC)	阳性质控 DNA 纯化液 (Extraction of Positive control DNA)	监控提取和扩增过程的有 效性	3

3. qPCR 反应体系配制

3.1 反应孔数计算：根据要检测的样品和对照数量，计算所需反应孔数，建议做 3 个重复孔/样。

3.2 *Myco* qPCR Mix 预混液反应数 N 计算：

Myco qPCR Mix 预混液反应数 N = (反应孔数+2 或 3)，2 或 3 为预留损失量。

3.3 将各组分子置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀后按照表 3 进行 *Myco* qPCR Mix 预混液配制，并充分混匀，短暂离心：

表 3. *Myco* qPCR Mix 预混液配制

组分	单孔用量	总量
2×qPCR Master Mix	15 μL	15 μL×N
<i>Myco</i> Primer & Probe Mix	4 μL	4 μL×N
无核酸酶水 (DNase/RNase-Free Water)	1 μL	1 μL×N

3.4 体系配制：吸取 *Myco* qPCR Mix 预混液 20 μL 按照排板分液到每孔，每孔加入对应样品。

表 4. 加样示例

反应孔	<i>Myco</i> qPCR Mix 预混液	模板	总体积
无模板对照 NTC	20 μL	10 μL DNase/RNase-Free Water	30 μL
阴性提取对照 NEC	20 μL	10 μL NEC 纯化液	30 μL
阳性提取对照 PEC	20 μL	10 μL PEC 纯化液	30 μL
阳性扩增质控 PAC	20 μL	1 μL 内部质控 DNA (IC) + 9 μL 阳性质控 DNA	30 μL
待测样品	20 μL	10 μL 待测样品纯化液	30 μL

注意：阳性扩增质控 PAC 在加模板时需单独加入内部质控 DNA (IC)，其它所有提取样品建议在提取时加入 7 μL IC。如未在提取时加入 IC，需在 *Myco* qPCR Mix 预混液配制时，将预混液中 1 μL 无核酸酶水替换为 1 μL IC。(如在预混液中加入 IC，则 NTC 体系需单独配制，NTC 不需要添加 IC。)

4. qPCR 程序设置与运行

以 ABI7500, 7500 software v2.4 为例:

4.1 新建实验 (New experiment), 输入实验名称, 选择标曲定量模式 (Quantitation Standard Curve), TaqMan reagents 和 Standard 模式;

4.2 在 Plate Setup 界面创建 FAM, 选报告荧光基团 (Reporter) 为 FAM, 淬灭基团 (Quencher) 为 None; 创建 VIC, 选报告荧光基团 (Reporter) 为 VIC, 淬灭基团 (Quencher) 为 None, 参比荧光 (Passive reference dye) 选 ROX;

4.3 在 Plate Setup 界面, 自定义样品名称;

4.4 设定靶标: 根据实验需要进行排板, **尽量将 NTC、NEC、PEC、PAC 分开排布, 以防加样污染影响检测结果 (如表 5 所示):**

表 5. 样品排板示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC										PAC	
B	NTC										PAC	
C	NTC				S1	S1	S1				PAC	
D					S2	S2	S2					
E	NEC				S3	S3	S3				PEC	
F	NEC										PEC	
G	NEC										PEC	
H												

S=Sample; NTC=No Template Control; NEC=Negative Extraction Control; PEC=Positive Extraction Control; PAC=Positive Amplification Control.

4.5 按表 6 设置 qPCR 反应程序

表 6. 反应程序

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
UDG 消化	1×	37°C	2 min	否
预变性	1×	95°C	30 s	否
循环反应	5×	95°C	10 s	否
		65°C	30 s	否
		72°C	30 s	否
循环反应	40×	95°C	10 s	否
		64°C	30 s	否
		72°C	30 s	是

4.6 反应体积选择 30 μ L，在 Run 界面点击“Start Run”开始运行 qPCR，待运行完毕进行分析。

【结果分析】

1. 分析设定:

1.1 ABI 7500 的设置 FAM 通道阈值 (Threshold) = 0.05, 基线 (baseline) 为自动基线 (Auto Baseline);

VIC 通道阈值 (Threshold) = 0.06, 基线 (baseline) 为自动基线 (Auto Baseline);

1.2 其他机型分析: 参数设置需要依据具体机型及软件版本, 也可由仪器自动判读;

2. 判定标准:

表 7. 质控样品结果分析

样品	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
PAC/PEC	Ct 值 ≤ 35	Ct 值 ≤ 35	阳性
阴性提取对照 NEC	Undetermined 或 Ct 值 > 35	Ct 值 ≤ 35	阴性
无模板对照 NTC	Undetermined 或 Ct 值 > 35	Undetermined 或 Ct 值 > 35	阴性

注: 若选做 PEC, PEC 的判定与阳性扩增质控 PAC 一致。

表 8. 待测样品结果分析

样品	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
待测样品	Ct 值 ≤ 35	Ct 值 ≤ 35	阳性
		Undetermined 或 Ct 值 > 35	提取或扩增抑制, 需复测
	Undetermined 或 Ct 值 > 35	Ct 值 ≤ 35	阴性
		Undetermined 或 Ct 值 > 35	提取或扩增抑制, 需复测

注: 所有质控和样品检测若做复孔; 如果复孔数为 2 或 3, 则至少 ≥ 2 个复孔出现阳性结果方能定性为阳性, 否则需复测。