

# GNM 支原体 DNA 检测试剂盒 (双重 qPCR-荧光探针法) 说明书

货 号:

**HCD0301-050(50T)**



## 一、试剂盒简介

支原体检测试剂盒 (qPCR) 是一种基于荧光探针法 qPCR 检测试剂盒, 可定性检测生物原料、细胞库、病毒种子、培养过程样品、细胞制品中可能产生支原体污染的产品。该试剂盒采用双重 qPCR 方法, 分别检测目标序列和内参 IC。内参可判断待测样本对扩增反应是否存在抑制, 防止出现假阴性结果; 也可在样品提取时加入 IC, 监测提取效果。

本试剂盒可覆盖 200 多种支原体、螺原体、无胆甾原体的定性检测, 具有高特异性, 与其他相关细菌物种无交叉反应性。参照 EP2.6.7 要求进行验证, 试剂盒检测限为 10 CFU/mL。

本试剂盒可搭配本公司核酸释放剂、支原体样品前处理试剂盒 (磁珠法) 试剂配套使用。

本试剂盒使用了 dUTP/UDG 防污染系统, 可防止假阳性结果出现, 保证结果准确性。

## 二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5°C条件下储存, 有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输, 开瓶后避光-20±5°C储存。
3. 产品批号, 生产日期见外包装盒。

## 三、试剂盒规格及组分

组分名称	HCD0301-050 (50T)	保存
2×qPCR Reaction Buffer	1 mL	-20±5°C
MyPri/Pro Mix	300µL	-20±5°C, 避光
阳性质控 (My PC)	100µL	-20±5°C
内部质控 (My IC)	100µL×3	-20±5°C
DNA 稀释液	1.5mL×2	-20±5°C

## 四、适用机型 (包括但不限于)

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

## 五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000µL、100µL、10µL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。



## 六、检测方法

### 实验流程 A（标准模式）

#### 1. 待测样本的 DNA 准备

- 1.1 建议配套使用本公司“支原体样品前处理试剂盒（磁珠法）”，提取样本 DNA。
- 1.2 将试剂盒放置 2~8°C 冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

#### 2. qPCR 反应体系的准备

- 2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 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 个提取阳性对照 PCS + 1 个提取阴性对照 NCS + N 个待测样品) × 2

- 2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按以下方案配置反应混合液。

表 1 反应混合液配置

组分	单孔用量/ $\mu\text{L}$
2×qPCR Reaction Buffer	15
MyPri/Pro Mix	4
IC*	1
总体积	20

\*若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中用 DNA 稀释液替代 IC。

#### 3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 $\mu\text{L}$  反应混合液及 10 $\mu\text{L}$  待测核酸样品，如表 2 所示。

表 2 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液 + 10 $\mu\text{L}$ 阳性质控	30 $\mu\text{L}$
无模板对照 NTC	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液 + 10 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	30 $\mu\text{L}$
提取阳性对照 PCS	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液 + 10 $\mu\text{L}$ PCS 纯化液	30 $\mu\text{L}$
提取阴性对照 NCS	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液 + 10 $\mu\text{L}$ NCS 纯化液	30 $\mu\text{L}$
待测样品	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液 + 10 $\mu\text{L}$ 待测样品纯化液	30 $\mu\text{L}$

注：①PCS 纯化液可使用 10 $\mu\text{L}$  PC + 190 $\mu\text{L}$  样品空白 buffer（或者 1×PBS）作为样品进行前处理获得，或根据实验室情况调整；

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

#### 4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，支原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法：

表 3 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5min	1
循环	95°C	5s	45
	60°C	30s	

反应体积选择 30 $\mu$ L，开始运行。

各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

## 实验流程 B（快速模式）

### 1. 待测样本的 DNA 准备

A、建议配套使用本公司“核酸释放剂”，获得样本 DNA；B、以细胞样本为例，在实验前几天，细胞需在 24 孔培养板上，用无抗生素的培养基进行培养，待细胞生长至 80%以上开始试验。

#### 1.1 样品为细胞（优选方案）

1.1.1 弃去培养皿内的细胞培养基。

1.1.2 用 1×PBS 或者生理盐水洗 2 次细胞。

1.1.3 加入适量的核酸释放剂（以 24 孔板为例，每孔 100μL）裂解细胞，室温放置 5 分钟。

1.1.4 收集细胞裂解液，放入离心管中。

1.1.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。

1.1.6 取 2μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

#### 1.2 样品为培养上清（代替方案）

1.2.1 取 1~1.5mL 细胞培养上清（含有细胞或细胞碎片），放入离心管中。

1.2.2 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟。

1.2.3 弃上清，用 1×PBS 或者生理盐水洗沉淀一次。

1.2.4 加入 100 μL 裂解液裂解样品，上下颠倒混匀后，室温放置 5 分钟。

1.2.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。

1.2.6 取 2 μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

### 2. qPCR 反应体系的准备

2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

$$\text{反应孔数} = (\text{1 个阳性质控 PC} + \text{1 个无模板对照 NTC} + \text{N 个待测样品}) \times 2$$

2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要的反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按表 4 配置反应混合液。

表 4 反应混合液配置

组分	单孔用量/μL
2×qPCR Reaction Buffer	15
MyPri/Pro Mix	4
IC	1
总体积	20

### 3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 $\mu$ L 反应混合液及 10 $\mu$ L 待测核酸样品，如表 5 所示。

表 5 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L 阳性质控	30 $\mu$ L
无模板对照 NTC	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L DNA 稀释液	30 $\mu$ L
待测样品	20 $\mu$ L 反应混合液+2 $\mu$ L 待测样品+8 $\mu$ L DNA 稀释液	30 $\mu$ L

注：由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，体积大于 2 $\mu$ L 可能会产生 PCR 扩增抑制。

### 4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

- 4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；
- 4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式；
- 4.3 选择报告荧光基团，支原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；
- 4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法，如下表 6 所示。

表 6 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	1
循环	95 $^{\circ}$ C	5s	45
	60 $^{\circ}$ C	30s	

反应体积选择 30 $\mu$ L，开始运行。

各实验室可根据所用**机型**进行设置反应程序。



## 七、结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

### 1. 分析设定

- 1.1 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 1.2 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

### 2. 结果判定

2.1 PC、NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 7。

表 7 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
PC	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NTC	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
PCS	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NCS	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线

注: ①快速模式实验流程无需检测 PCS、NCS, 即该模式下无需进行 PCS、NCS 分析。

②质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

2.2 待测样品检测结果判断, 参考表 8。

表 8 待测样品结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判定
Ct<40 且有明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阳性
	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	阳性, 有抑制
Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阴性
	Ct≥40, 或无明显的扩增曲线	无法判断, 有抑制

注: 若出现有抑制的情况, 需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。

## 八、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需严格按照说明书操作步骤使用，以保证最佳的检测结果。
3. 提取阳性对照 PCS，可以加入 10 $\mu$ L PC+190 $\mu$ L 样品空白 buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样本提取，或根据实验室情况调整。
4. 若在提取时加入 IC，可以在待测样品中加入 10 $\mu$ L IC，50 $\mu$ L 洗脱，10 $\mu$ L 上样。
5. IC 通道荧光可以根据实验室情况选择是否收集及后期数据处理。
6. 由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，PCR 扩增体积应小于 2 $\mu$ L。
7. 试剂盒组分建议在低温下融化使用。
8. 建议使用带滤芯吸头。

## 九、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。