

# 支原体 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-ZY002

## 产品简介

支原体 DNA 检测试剂盒可用于定性检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批、对照细胞以及临床治疗用细胞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 JPXVII 支原体检测相关要求进行了验证，可覆盖 100 多种支原体，且与密切相关的菌种无交叉反应，检测快速，在 2h 内可完成检测工作，专一性强。

## 规格

50 Reactions

## 试剂盒组成

序号	组分	规格	存储条件
1	支原体 Primer&Probe MIX	120 $\mu$ L $\times$ 1 管	-20 $^{\circ}$ C及以下避光
2	2 $\times$ qPCR Reaction MIX	700 $\mu$ L $\times$ 1 管	-20 $^{\circ}$ C及以下
3	内控 (Internal Control)	220 $\mu$ L $\times$ 1 管	
4	阳性模板 (Positive Control)	500 $\mu$ L $\times$ 1 管	
5	DNA 稀释液	1.5 mL $\times$ 3 管	

## 储存条件与有效期

试剂盒应在 -20 $^{\circ}$ C 及以下条件下保存，有效期为 12 个月。开封后未使用完的试剂盒注意仍在规定储存条件下保存。生产日期和有效期见试剂盒标签。

## 操作方法

### 一、准备工作

- 试剂盒准备  
将试剂盒各组份置于冰上或 4 $^{\circ}$ C，确保充分溶解开始操作。
- 需自备的耗材及设备
  1. 荧光定量 PCR 仪、涡旋仪、离心机

2. 高精度移液器及一次性无菌无酶低吸附带滤芯吸头 (0.1-2.5 μL、0.5-10 μL、10-100 μL、20-200 μL、100-1000 μL)
3. 1.5 mL 无菌无酶低吸附离心管
4. 无菌无酶八联管或 96 孔 qPCR 板

## 二、操作流程

### • 操作详细步骤

#### 1、待测样本的提取：

建议使用谱新生物“支原体 DNA 样本前处理试剂盒 (HG-CL200)”提取样本 DNA。在加入样本的同时，加入 4 μL 的内控 (Internal Control)。提取样本时，建议同步提取 DNA 稀释液作为阴性对照。

#### 2、qPCR 反应液的制备：

2.1 根据所需检测的参考品和待测样品数量（一般做 2-3 组复孔），计算反应所需孔数：

反应孔数 = (1 个无模板对照 NTC+1 个阳性对照 PC+ 待测样品) × 复孔数

2.2 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量：

qPCR MIX = (反应孔数 +2 或 3) × 12.5 μL (2×qPCR Reaction MIX) + (反应孔数 +2 或 3) × 2.1 μL (支原体 Primer&Probe MIX) + (反应孔数 +2 或 3) × 0.4 μL (Internal Control) (2 或 3 为操作损失量)

2.3 将所用试剂置于冰上完全溶解，轻微振荡混匀，瞬时离心，按下表所示配制：

表 2. qPCR Mix 配制表

组分	单个反应量
2×qPCR Reaction MIX	12.5 μL
支原体 Primer&Probe MIX	2.1 μL
内控 (Internal Control)	0.4 μL
总体积	15 μL

【注】：如果在提取时已加入内控，则配制 qPCR MIX 时，用等体积的 DNA 稀释液代替。

2.4 将配制的 qPCR MIX，轻微振荡混匀，瞬时离心，按 15 μL/ 孔分装至八联管或者 96 孔板中。

2.5 将 DNA 稀释液按 10 μL/ 孔加到分装了 qPCR MIX 八联管或者 96 孔板中，具体加样见表 4。

已融化未使用的 DNA 稀释液可在 2-8°C 短暂保存，若长期不使用，请储存于 -20°C。

#### 3、qPCR 加样：

3.1 将所需试剂置于冰上操作，轻微振荡混匀，瞬时离心，加样（总体积 25 μL）：

表 4. Mix 各反应孔加样示例

阳性组	阳性模板各 10 μL+ 所需 qPCR MIX 量 15 μL
阴性组	DNA 稀释液各 10 μL+ 所需 qPCR MIX 量 15 μL
实验组	待测样品各 10 μL+ 所需 qPCR MIX 量 15 μL

3.2 实验可使用无菌无酶的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心至管底准备反应。

## PCR 程序设置

支原体检测荧光基团选择 FAM，淬灭基团为 None，内控荧光基团选择 CY5，淬灭基团为 None，参比荧光为 ROX（根据仪器要求选择）。

反应程序：

Stage1	污染消化	Reps: 1	37°C	2 min
Stage2	预变性	Reps: 1	95°C	30 s
Stage3	循环反应	Reps: 45	95°C	10 s
			58°C	34 s

程序中 58°C 34 s 处设置为荧光收集；反应体积 25  $\mu$ L。

## 结果分析

	FAM 信号	CY5 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

## 注意事项

- 1、本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
- 2、阴性样品（2×qPCR Reaction MIX、Primer&Probe MIX 和 DNA 稀释液等）和阳性样品（PC 和待测样品等）的配制和加样环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。
- 3、注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖，使用移液器移液时，需避免液体挂壁。
- 4、试剂盒必须在有效期内使用，不建议不同批次的相关试剂混用。
- 5、试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且需确保其充分溶解，各组分使用前需充分混匀，以保证试剂的均一性，经混匀的试剂需经短暂离心，以使管壁及盖子上的液体全部集中于管底。若发现 DNA 稀释液中有析出物，建议于 37 °C 条件下进行孵育，使 DNA 稀释液完全溶解。
- 6、只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
- 7、最终的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。
- 8、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本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。
- 9、本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

## 免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

