



## 支原体快速检测试剂盒 (qPCR)

货号：OPA-S102

规格：50 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×2 管	-15 ~ -30°C备注: 2×qPCR Master Mix 和 Primer& Probe Mix 需避光保存
<i>Myc</i> o Primer& Probe Mix		200 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)		200 μL×2 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 12 个月，有效期见外包装盒标签。

## 【试验所需自备器材】

荧光定量 PCR 仪；1.5mL 无菌低吸附离心管；qPCR 专用无菌无酶八联管或 96 孔板

1000μL，100μL，20μL，10μL 移液器；1000μL，100μL，20μL，10μL 无菌低吸附带滤芯枪头

## 【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

- 将试剂盒从冰箱取出，将试剂置于冰上融化，涡旋振荡混匀 20-30s 并瞬时离心。
- 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 1min，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)	Evaluate the detection of Positive Control DNA	2或3
无模板对照 (No Template Control, NTC)	No DNA	Monitor for contaminate of qPCR reagents	2 或 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)	Monitor for contamination of the extraction reagents, equipment, and work areas.	2或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)	Verify reagent and system performance. Evaluate the efficiency of DNA extraction and detection from test samples.	2 或 3

### 3 . qPCR 反应体系配制

- 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**；
- *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；
- 将各组分置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀后按照表 2 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	15μL	15μL×N
<i>Myco</i> Primer& Probe Mix	4μL	4μL×N

- 体系配制：吸取 *Myco* qPCR Mix 预混液 19 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	内部质控 DNA (IC)	DNase/RNase-Free Water	Sample
无模板对照 NTC	19 μL	0	1 μL	10 μL DNase/RNase-Free Water
阴性提取对照 NEC	19 μL	0	1 μL	10μL NEC 纯化液
阳性提取对照 PEC	19 μL	0	1 μL	10μL PEC 纯化液
阳性扩增质控 PAC	19 μL	1 μL	0	10μL 阳性质控 DNA
待测样品	19 μL	0	1 μL	10μL 待测样品纯化液

加样完成后总体积为 30μL。

### 4 . qPCR 程序设置与运行

以 ABI7500, 7500 software v2.4 为例：

- 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；
- 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;

- 在 Plate Setup 界面, 自定义样品名称;
- 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.

- 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	2min	否
预变性	1×	95°C	30s	否
循环反应	5×	95°C	10s	否
		65°C	30s	否
		72°C	30s	否
循环反应	40×	95°C	10s	否
		64°C	30s	否
		72°C	30s	是

反应体积选择 30 $\mu$ 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 ABI7500 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。**