

支原体 DNA 检测试剂盒
(PCR-荧光探针法) (快速版)
说明书

货号：1509101

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

MycoSHENTEK®支原体 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）（快速版）与 MycoSHENTEK®支原体 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）（快速版）配套使用，定性检测原辅料、主细胞库、工作细胞库等细胞培养物以及生产工艺过程中各类基质样品下是否有支原体、螺原体、无胆甾原体、虫原体及中间原体污染，检测限可达 10 CFU/mL。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术，可快速定性检测约 200 种支原体、螺原体、无胆甾原体、虫原体及中间原体 DNA；经过多种支原体、非支原体和常见工程细胞 DNA 检测，特异性强；本试剂盒含 dUTP，可使用 UNG 酶系统以预防污染，有效避免假阳性结果的出现。

Fast MyInternal Control (IC)可在 PCR 扩增反应阶段加入，以判断待检样品对扩增反应是否存在抑制，防止假阴性结果的产生；也可在样品提取阶段加入，以评估提取效果。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Fast MyInternal Control (IC) *	NNA071	冻干粉 × 2 管	-18 °C及以下
Fast MyPositive Control (PC) *	NNA072	冻干粉 × 2 管	-18 °C及以下
Fast MyqPCR Reaction Buffer	NNB025	425 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
Fast MyPrimer&Probe MIX	NNC135	75 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 2 管	-18 °C及以下

* IC、PC 分别使用 600 μL、500 μL DNA 稀释液复溶。

■ 规格

100 Reactions

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于以下机型，使用前需验证检测灵敏度）

➤ SHENTEK-96S

- 7500 Real-Time PCR System
- Roche LightCycler 480 II

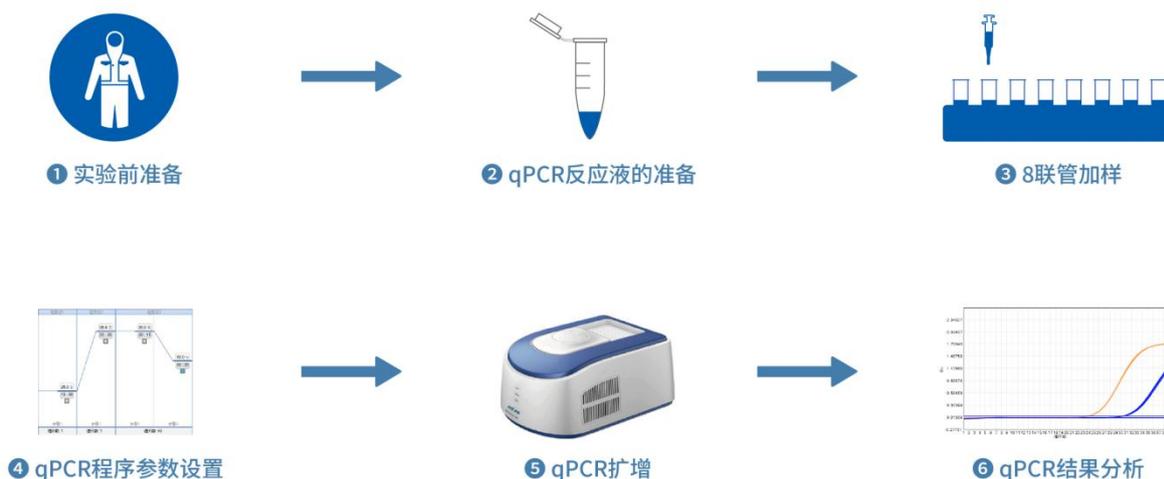
■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 八联管或 96 孔 qPCR 板
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 75%酒精
- UNG 酶 (确定使用前建议验证酶效果)

■ 相关设备

- 超净台或生物安全柜
- 迷你离心机
- 微孔板离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程



一、实验前准备

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 °C以下区域转移至 2-8 °C区域或冰上融化，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

二、qPCR 反应液的准备

1. 根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数，一般做 2 个重复孔。

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

PC、NTC 监控检测过程；PCS、NCS 监控提取和检测过程。

2. 各试剂根据表 2 所示准备 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表*

组分	检测样品单孔用量	提取样品单孔用量
Fast MyqPCR Reaction Buffer	8.5 μL	8.5 μL
Fast MyPrimer&Probe MIX	1.5 μL	1.5 μL
Fast MyInternal Control (IC)	0.5 μL	/**
DNA 稀释液	/	0.5 μL
总体积	10.5 μL	10.5 μL
UNG 酶***	0.1 U	0.1 U

* 配制 qPCR MIX 时建议根据反应孔数增加 10%的损耗量。

**样品提取时已加入 IC，则配制 qPCR MIX 时添加等体积的 DNA 稀释液。

***建议添加 UNG 酶降低气溶胶污染风险，使用前建议验证酶用量及效果。

三、加样

1. 将所有溶液振荡混匀后根据表 3 所示加样, 排版方式可参考表 4:

表 3.各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
阳性质控 PC	10.5 μ L qPCR MIX + 20 μ L PC
无模板对照 NTC	10.5 μ L qPCR MIX + 20 μ L DNA 稀释液
阴性对照样品 NCS	10.5 μ L qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
阳性对照样品 PCS	10.5 μ L qPCR MIX + 20 μ L PCS 纯化液
待测样品	10.5 μ L qPCR MIX + 20 μ L 待测样品纯化液

表 4.96 孔板排版示例

NTC	NCS				S1	S1				PCS	PC	A
NTC	NCS				S2	S2				PCS	PC	B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
					S8	S8						H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

✧ 该示例表示的是检测 1 个阳性质控 PC、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样品 NCS、1 个阳性对照样品 PCS、8 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。

✧ 实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

2. 将八联管用配套管盖盖紧或 96 孔版用光学膜封闭, 置于 PCR 管振荡混合仪中振荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪。

四、qPCR 程序参数设置

- 1、以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

- 1) 点击“实验向导”。
- 2) “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
- 3) 选择步骤 2: 选择项目中的“支原体快速检测”程序。
- 4) 实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

- 2、其他定量 PCR 系统程序设置如下:

- 1) 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 2) 创建新检测探针, 命名为“支原体快速检测”, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 创建 ROX 探针, 选择报告荧光基团为 ROX, 猝灭荧光基团为 none, 检测参比荧光为 none。
- 3) 设置三步法反应程序:

表 5.反应程序设置

步骤	温度	时间(mm:sec)	循环
UNG 酶*	25 °C	10:00	1
预变性	95 °C	03:00	1
变性	95 °C	00:15	40
退火/延伸	60 °C**	00:20***	

*若 qPCR MIX 配制时未添加 UNG 酶, 则该步省略。

**仪器将在此步骤中读取荧光信号。

***以 7500 Real-Time PCR System 为例, 若所使用 qPCR 仪器性能无法满足 60°C 20 秒退火要求, 可设置为 60°C 30 秒及以上。

五、结果分析

1、以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

- 1) “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照, PC 孔、PCS 孔设置为阳性对照, NCS 孔设置为阴性对照, 待测样品孔设置为待测样品。
- 2) 在“实验分析”页面点击  , 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品等检测值。

2、以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

- 1) 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 设置合适的阈值线, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PC 孔、PCS 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、PCS, 之后点击  。

3) 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品等检测值。

具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

六、判定标准

1. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果参考表 6:

表 6.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	ROX 信号
NTC	2 复孔未检出或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<32 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔未检出或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<32 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<32 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<32 且有效的“S”型扩增

质控标准应基于实验室验证数据, 可从满足检测限要求考虑。

2. 待测样品检测结果判定参考表 7:

表 7.待测样品检测结果分析

FAM 信号	ROX 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct<40 且有效的“S” 型扩增	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct≥35 或扩增曲线无明显起峰	阳性, 有抑制
2 复孔未检出或扩 增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct≥35 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断, 有抑制

若阴性质控 Ct 值有检出但 Ct 值大于 10 CFU/mL 菌株 2 个循环及以上, 则可判定阴性质控符合要求。

阴阳性质控符合要求时, 若待测样品 Ct 值有检出但 Ct 值大于 10 CFU/mL 菌株 2 个循环及以上, 也可判定为阴性。

ROX 信号如果有抑制, 需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。

如遇特殊样品或其他异常现象, 结果难以判定, 可联系湖州申科, 咨询具体解决方案。

生效日期: 2024 年 11 月 19 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189