

支原体 (Mycoplasma) DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN08-50

版本：07 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

【产品名称】

支原体 (Mycoplasma) DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

50 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测细胞培养物、实验动物分泌物、动物血清等各种生物材料中是否有支原体污染。

【产品简介】

本试剂盒利用 PCR-荧光探针法,针对支原体 16S rRNA 序列保守区域设计特异性引物探针,特异性扩增支原体 DNA。具有操作简便, 检测快速, 特异性强, 灵敏度高的特点。

内标 (IC) 可在样品提取阶段加入, 以评估提取效果; 也可在 PCR 扩增反应阶段加入, 以监控扩增反应是否存在抑制, 防止假阴性结果的产生。

本试剂盒含有 UDG 酶, 用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒 I (磁珠法) 配套使用, 高效提取样品中的支原体 DNA, 检测限可达到 5 CFU/ml。

【主要成分与含量】

试剂盒中含有如下组分:

试剂盒组分	规格 (50 Reactions/盒)
My qPCR MIX	1.0mL×1 管
My 阳性对照	1.5mL×2 管
My 阴性对照	1.5mL×2 管
My 内标	1.0mL×1 管
说明书	1 份

说明:

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂: 核酸提取或纯化试剂盒。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于≤-20°C避光储存, 有效期为 24 个月。
2. 试剂盒避免反复冻融, 冻融次数不宜超过 7 次。
3. 产品批号及有效期: 见产品外包装。

【适用机型】

包括但不限于以下机型: SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统; ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪; Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪; 伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【相关设备】

超净工作台或生物安全柜、掌上离心机、涡旋混匀仪、荧光定量 PCR 仪、不同规格的移液器。

【检验方法】

1. 实验前准备

注意实验环境的控制, 建议尽量在超净工作台或生物安全柜中进行实验操作, 工作台面、移液枪及离心管架用紫外照射 30min 后, 用 75% 酒精喷洒并擦干。

2. 试剂准备

从试剂盒中取出 My qPCR MIX、My 内标、My 阴性对照、My 阳性对照, 置于室温融化, 充分震荡混匀后瞬时离心备用。

根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数 N，一般做 2 个重复孔。N= (待检样本数+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性对照样本 NCS+1 个阳性对照 PC+1 个阳性对照样本 PCS) ×2。

根据计算的检测数量，将 My qPCR MIX 按照每孔 20 μ L 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

3. 核酸提取纯化

使用核酸提取或纯化试剂盒对阴性对照，阳性对照，待测样本进行核酸的提取纯化，操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，内标加样量为 10 μ L，样本量为 200 μ L。

4. 扩增和检测

4.1 按照 20 μ L/管分装量将 My qPCR MIX 分装至反应管后，按下列表格分别加入阴性对照、阳性对照、处理好的待测核酸配制反应液：

组分	单孔用量 (μ L)
My qPCR MIX	20
模板 DNA	20
总体积	40

*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时不设置 ROX 通道，结果分析时无需关注 ROX 结果。

*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1 μ L 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21 μ L/反应，此时 PCR 总反应体积为 41 μ L/反应。

4.2 孔板排版布局可参考下表：

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

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

*实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版布局。

4.3 将上述配制好的反应液，盖好反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.4 将反应管放置在荧光 PCR 仪样品槽中，在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50°C: 2 分钟	1
预变性	95°C: 3 分钟	1
PCR 扩增	95°C: 10 秒, 60°C (采集荧光) : 30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX，其中 FAM 为靶标基因，ROX 为内标基因。若仪器为 ABI 系列时，参比荧光选择 none。

5. 结果判定

5.1 阈值线的设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。若需要手动调节，以刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。阈值线设定应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

5.2 实验成立条件

质控样品	FAM 信号	ROX 信号
NTC	2 复孔 $C_t \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增
NCS	2 复孔 $C_t \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增
PC	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增
PCS	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增

*质控标准应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

5.3 结果判定

FAM 信号	ROX 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 $C_t < 40$ 且有效的 "S" 型扩增	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增	阳性
	2 复孔 $C_t \geq 35$ 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 $C_t \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $C_t < 35$ 且有效的 "S" 型扩增	阴性
	2 复孔 $C_t \geq 35$ 或扩增曲线无明显起峰	阴性无法判断，有抑制

*ROX 信号如果有抑制，需重测或查找并排除抑制因子。

【注意事项】

- 1、试剂盒应在-20°C以下保存运输。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、对于顶部采光仪器要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触反应管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、阳性对照等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本中靶标为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。

【免责声明】

本产品仅供研究用，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

