

TransDetect® qPCR Mycoplasma Detection Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM321

版本号: Version 1.1

保存: -20°C避光保存两年

产品说明

本产品采用TaqMan实时荧光定量PCR法检测支原体DNA, 用于定性检测如培养基、细胞培养物、生物制品等样品中的支原体污染。可检测的支原体种类涵盖范围广, 包括柔膜菌纲 (*Mollicutes*) 下的多种支原体 (*Mycoplasma spp.*)、无胆甾原体 (*Acholeplasma spp.*)、螺原体 (*Spiroplasma spp.*) 等。本试剂盒按照EP 2.6.7和JP G3支原体检测相关指南和要求进行验证。

本试剂盒中的TransDetect® qPCR Mycoplasma SuperMix组分包含Taq热启动酶、针对支原体检测特殊优化的qPCR反应缓冲液、dNTPs、PCR增强剂、稳定剂。此外, 本反应液引入了dUTP/UDG系统, 可在反转录前降解含U的ssDNA和dsDNA, 消除由PCR产物导致的交叉污染。Primer&Probe Mix为扩增支原体序列和扩增Internal Control的引物、探针。FAM通道检测支原体特异性扩增; VIC通道检测Internal Control的扩增。Internal Control可PCR反应阶段加入, 排除因样品中含有PCR抑制因素导致的假阴性结果; 内部对照 (IC) 也可在样品提取阶段加入, 以评估提取效果, 排除DNA提取不当而导致的假阴性。本试剂盒与支原体DNA提取纯化试剂盒MagicPure® 32 Mycoplasma DNA Kit (EH401-32) 配套使用, 高效提取样品中的支原体DNA, 检测限可达到10 CFU/ml。

特点

- 符合EP2.6.7以及JP G3中核酸扩增技术 (NAT) 检测支原体的要求, 灵敏度高、支原体种类覆盖范围广、耐用性优、特异性优。
- 本品包含dUTP/UDG防污染系统, 有效防止PCR产物的交叉污染, 数据准确。

试剂盒组成

Component	FM321-00	FM321-01
TransDetect® qPCR Mycoplasma SuperMix	400 µl	800 µl
Primer&Probe Mix	75 µl	150 µl
Internal Control	500 µl	1 ml
Positive Control	200 µl	400 µl
Nuclease-free Water	500 µl	1 ml

样品纯化

为了保证检测灵敏度, 建议进行DNA提取后再使用本试剂盒做支原体检测。推荐使用MagicPure® 32 Mycoplasma DNA Kit (EH401-32) 进行DNA提取, 并参照说明书进行操作。

在样品提取时可以加入Internal Control, 用于验证提取是否正常以及提取产物是否有PCR抑制成分。每个提取样品中加入Internal Control量为10 µl, 具体参照EH401-32产品说明书。

qPCR检测

1. 确定反应孔数

反应孔数 = (待测样品数 + 抽提阴性对照 (NCS) 样品数 + 无模板对照 (NTC) 1个 + 阳性对照1个) × 重复数
待测样品为提取后的DNA样品, 抽提阴性对照 (NCS) 样品为支原体阴性样品的抽提回收产物。

2. 准备试剂 (在试剂准备区进行)

取出试剂盒中的各组分, 室温放置, 待温度平衡至室温, 混匀后备用。



3. qPCR反应液配制（在试剂准备区和样品处理区进行）

按照下表配制qPCR反应液。需配制反应体系数 $N = \text{反应孔数} + 1$ 。在试剂准备区混合TransDetect® qPCR Mycoplasma SuperMix和Primer&Probe Mix组分，然后在样品处理区加入Internal Control。将配制好的qPCR反应液充分混匀后瞬时离心，待用。

Component	Volume
TransDetect® qPCR Mycoplasma SuperMix	8 $\mu\text{l} \times N$
Primer&Probe Mix	1.5 $\mu\text{l} \times N$
Internal Control	0.5 $\mu\text{l} \times N$

*如果在提取时已加入Internal Control，配制qPCR反应液时应使用Nuclease-free Water替代Internal Control。

4. NTC和阳性对照模板的准备（在样品处理区进行）

按下述方法准备NTC和阳性对照模板。

*如果qPCR反应液配制时加入了Internal Control，直接使用Nuclease-free Water做NTC模板，Positive Control做阳性对照模板；

*如果qPCR反应液配制时未加入Internal Control，需在NTC模板和阳性对照模板中加入Internal Control，比例为20 μl 样品加入0.5 μl Internal Control，具体为：

NTC模板的制备方法：复孔数 $\times 20 \mu\text{l}$ Nuclease-free Water+复孔数 $\times 0.5 \mu\text{l}$ Internal Control

阳性对照模板的制备方法：复孔数 $\times 20 \mu\text{l}$ Positive Control+复孔数 $\times 0.5 \mu\text{l}$ Internal Control

5. 加样（在样品处理区进行）

(1) 向每个PCR管中分装加入前一步准备好的qPCR反应液10 μl 。

(2) 在已分装qPCR反应液的反应孔中加入20 μl 模板：阳性对照模板、NTC模板、抽提阴性对照（NCS）、待测样品，参考下表

阳性对照	10 μl qPCR反应液+20 μl 阳性对照模板
NTC	10 μl qPCR反应液+20 μl NTC模板
抽提阴性对照（NCS）	10 μl qPCR反应液+20 μl 抽提阴性对照（NCS）样品
待测样品	10 μl qPCR反应液+待测样品

建议以上四类样品在反应孔设计布板时分区放置，以免互相污染，导致测试结果不准确。盖上管盖或使用光学膜封闭后，轻柔振荡混匀，离心使液体全部沉于管底。

6. qPCR扩增（在扩增区与分析区进行）

将PCR反应管放入扩增仪样品槽，按照对应的顺序设置阴性对照（NTC）、阳性对照、待测样品。读取FAM通道和VIC通道，反应体积设置为30 μl ，反应程序为：

温度	时间	循环数
95°C	5 min	1
95°C	5 sec	45
62°C	30 sec (信号采集)	

结果分析

阳性对照和阴性对照（NTC）的扩增结果需满足下表

样品	FAM通道	VIC通道
阳性对照	$C_t < 40$	$C_t < 40$
NTC对照	$C_t \geq 40$	$C_t < 40$



按照下表进行待测样品的结果判定

FAM通道	VIC通道	结果判定
Ct < 40	Ct < 40	支原体阳性
Ct < 40	Ct ≥ 40	存在PCR抑制成分
Ct ≥ 40	Ct < 40	支原体阴性
Ct ≥ 40	Ct ≥ 40	存在PCR抑制成分

VIC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。

注意事项

- 使用时彻底化冻、混匀。
- 本产品仅用于科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理需严格遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所有消耗品仅作一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用仪器和设备，各区各阶段用品不可交叉使用。样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求。





品质高于一切
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.1-202305

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

Website www.transgen.com

E-mail trans@transgen.com

Customer Service +86-400-898-0321

Phone +86-10-57815030

