

DfCell Mycoplasma RT-qPCR Detection Kit

DfCell 支原体快速检测试剂盒 (RT-qPCR)

产品简介

DfCell Mycoplasma RT-qPCR Detection Kit 是基于 NAT (nucleic acid amplification techniques) 的一种快速定性检测生产原料、细胞库、病毒种子、病毒或细胞收获液、治疗用细胞中潜在支原体污染的产品。该试剂盒基于定量 PCR 技术, 采用多重 PCR 的方法, 使用 2 种荧光探针, FAM 和 VIC, 分别检测目标序列和内参。可覆盖 100 多种支原体 DNA 序列; 并且严格按照 EP 2.6.7 进行专属性、检测限、耐用性验证, 检测限满足 ≤ 10 CFU/mL 的要求, 具备灵敏度高、特异性好、安全性好等特点。

产品信息

货号	C230106E / C230106S
规格	25 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	C230106E	C230106S
C230106-A	4×qPCR Reaction Buffer	250 μ L	1 mL
C230106-B	Primer & Probe Mix	25 μ L	100 μ L
C230106-C	Internal Control (IC)	25 μ L	100 μ L
C230106-D*	Positive Control (PC)	500 μ L	2 mL
C230106-E**	DNA Dilution Buffer	1 mL	4×1 mL
C230106-F***	ddH ₂ O	500 μ L	2×1 mL

*阳性对照 (PC) : 浓度为 1,000 copies/ μ L;

**DNA 稀释液: 用于样本和 IC 稀释、以及 NTC 和 NC 的模板;

***超纯水: 用于制备 qPCR Mix 体系。

储存条件

25~-15°C保存, 有效期 1 年。注意 C230106-B 需要避光保存。

注意事项

1. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书, 实验应规范操作, 包括样本处理、反应体系的配制及加样。
2. 加样和配液步骤都尽量在冰上操作。
3. 每个组分在使用前都应震荡混匀, 低速离心。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 实验前准备

- 1) 提前准备实验所需试剂耗材；
- 2) 确认仪器适配性：

本试剂盒适配的 qPCR 机型包含但不限于以下仪器：

A:Bio-Rad: CFX96

B:Thermo Scientific:7500 Real-Time PCR System; QuantStudio™5;

2. 实验方法

1) 待测样本 DNA 提取

建议使用磁珠法核酸提取试剂。本试剂盒包含内部对照（IC）。如果在 DNA 提取前将 IC 加入样品中，可以验证整个过程（包括 DNA 提取和 qPCR 反应）。如果将 IC 直接添加到 qPCR Mix 中，IC 将仅作为 qPCR 对照。

2) qPCR 反应体系的准备

a. 根据所要检测样本的数量，包括阳性对照（PC），无模板对照（NTC），抽提阴性对照（NC）和待测样本（TS），根据实验设计，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

阳性对照（PC）：Positive control solution；无模板对照（NTC）：No template control；

抽提阴性对照（NC）：Negative control solution；

待测样本（TS）：Test sample。

PC 和 NTC 为无需进行提取前处理的样本；NC 和 TS 为需要进行提取前处理的样本。

反应孔数（M1）= $(1 \times \text{NC} + \text{N} \times \text{TS}) \times 2$

反应孔数（M2）= $(1 \times \text{PC} + 1 \times \text{NTC}) \times 2$

反应孔数（M3）= $(1 \times \text{PC} + 1 \times \text{NTC} + \text{N} \times \text{TS}) \times 2$

b. 根据实验设计以及下面对应表格中的反应体系，提前将所需试剂放置冰上融化。

c. 根据反应孔数计算所需要的 qPCR Mix 的量。

【注意】如果使用该产品用于产品放行等 GMP 活动中，则推荐按照表 1 和表 2 配置体系；如果仅用于研发实验中，用户自行评估实验情况后认为无需提取前将 IC 加入 TS 中或无需做 NC 对照，也可按照表 3 配置体系。并非 M1, M2, M3 都需要配制。

表 1 反应孔数（M1）对应的 qPCR Mix 体系*

组分	体积（1×40 μL 反应体系）	体积（M1×40 μL）
4×qPCR Reaction Buffer	10 μL	$(M1+2) \times 10 \mu\text{L}$
Primer & Probe Mix	1 μL	$(M1+2) \times 1 \mu\text{L}$
ROX	X μL / 0 μL**	$(M1+2) \times X \mu\text{L} / 0 \mu\text{L}$
ddH ₂ O	Up to 20 μL	Up to $(M1+2) \times 20 \mu\text{L}$
Total	20 μL	$(M1+2) \times 20 \mu\text{L}$

*表 1 中的配置体系是基于 NC 和 TS 都是在提取前加入 IC 的前提下,则无需在配置 qPCR Mix 时再加入 IC。提取前加入 IC 的方法: 首先将试剂盒 IC 用 DNA 稀释液稀释 20 倍, 每 100 μL 检测样本加入 1 μL 稀释后的 IC 后进行提取。

**本试剂盒不含 ROX 参比染料, 若您目前使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料, 请具体参考其说明书进行 ROX 添加。若不需要添加 ROX 参比染料, 则添加体积为 0 μL 。

表 2 反应孔数 (M2) 对应的 qPCR Mix 体系

组分	体积 (1 \times 40 μL 反应体系)	体积 (M2 \times 40 μL)
4 \times qPCR Reaction Buffer	10 μL	(M2+2) \times 10 μL
Primer & Probe Mix	1 μL	(M2+2) \times 1 μL
Internal Control (IC)	1 μL^*	(M2+2) \times 1 μL /0 μL
ROX	X μL /0 μL^{**}	(M2+2) \times X μL /0 μL
ddH ₂ O	Up to 20 μL	Up to (M2+2) \times 20 μL
Total	20 μL	(M2+2) \times 20 μL

*表 2 中的配置体系是基于 PC 和 NTC 都是未在提取前加入 IC 的前提下,则需要在配置 qPCR Mix 时加入 IC。提取后加入 IC 的方法: 将 IC 用 DNA 稀释液稀释 100 倍后每个反应体系中加入 1 μL 。

**本试剂盒不含 ROX 参比染料, 若您目前使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料, 请具体参考其说明书进行 ROX 添加。若不需要添加 ROX 参比染料, 则添加体积为 0 μL 。

表 3 反应孔数 (M3) 对应的 qPCR Mix 体系

组分	体积 (1 \times 40 μL 反应体系)	体积 (M3 \times 40 μL)
4 \times qPCR Reaction Buffer	10 μL	(M3+2) \times 10 μL
Primer & Probe Mix	1 μL	(M3+2) \times 1 μL
Internal Control (IC)	1 μL^*	(M3+2) \times 1 μL /0 μL
ROX	X μL /0 μL^{**}	(M3+2) \times X μL /0 μL
ddH ₂ O	Up to 20 μL	Up to (M3+2) \times 20 μL
Total	20 μL	(M3+2) \times 20 μL

*表 3 中的配置体系是基于提取前样本中不加入 IC 的前提下,则需要在配置 qPCR Mix 时加入 IC。提取后加入 IC 的方法: 将 IC 用 DNA 稀释液稀释 100 倍后每个反应体系中加入 1 μL 。

**本试剂盒不含 ROX 参比染料, 若您目前使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料, 请具体参考其说明书进行 ROX 添加。若不需要添加 ROX 参比染料, 则添加体积为 0 μL 。

3) 加样

- 充分震荡混匀 qPCR Mix, 低速离心, 将管盖残留液体收集至管底。
- 向每孔反应管中分装 20 μL 对应样本的 qPCR Mix。

【注意】各样品管中分装的 qPCR Mix 需要与上一步“qPCR 反应体系的准备”中配置的 qPCR Mix 保持一致, 与样品一一对应, 避免加错。

- 向已分装过 qPCR Mix 的反应管中加入样品, 参考表 4。

表 4 加样示例

样本	向每管或孔中加入…
TS	20 μL qPCR Mix+20 μL 待测样本纯化液
NTC	20 μL qPCR Mix+20 μL DNA 稀释液
NC*	20 μL qPCR Mix+20 μL NC 纯化液*
PC	20 μL qPCR Mix +20 μL 阳性对照

*每管或孔中最终反应体积为 40 μL。

**NC 推荐使用 DNA 稀释液作为样本进行前处理。

***注意盖上反应管盖子或者贴上光学膜，为避免影响荧光信号读取，请注意不要在管盖或者膜上做标记，或者用刮板反复摩擦。

****完成加样后，先短时低速离心反应管或反应板，再充分震荡混匀然后短时低速离心，将管盖和管壁的残留液体收集至管或板底。操作时尽量避免气泡产生。这一步非常重要，不混匀或者混匀不彻底会影响基线平稳。

4) qPCR 程序参数设置

a. 程序文件设置：

以 Thermo Scientific:7500 Real-Time PCR System 仪器和 Real-Time PCR Software v2.4 为例：仪器类型：7500 (96 Wells)

实验类型选择：Quantitation-Standard Curve；检测目标序列的试剂：Taqman® Reagents

程序速度：Standard (~2 hours to complete a run)

b. 检测通道设置：

在“Plate Setup”的“Define Targets and Samples”中，创建 Target 1 通道 (FAM)，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 MGB 或 none；创建 Target 2 通道 (VIC)，选择报告荧光基团为 VIC，猝灭荧光基团为 none。在“Plate Setup”的“Assign Targets and Samples”中，如果没有额外加入 ROX 染料，则选择“none”；如果额外加入了 ROX，则选择“ROX”。

c. 标准扩增程序设置：

表 5 标准扩增程序

编号	反应阶段	温度	时间	循环数
1	预变性	95°C	5 min	1
2	变性	95°C	15 sec	45
3	退火/延伸 (荧光信号收集)	62°C	30 sec	

d. 基线和阈值设置：

基线调整原则：基线通常按照自动设置的基线即可。如需手动调整，基线起始循环数选择在指数增长期之前，其中起点设置需要避开起始荧光采集的波动区，终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1-2 个循环。

阈值设置原则：通常采用自动阈值。如需手动调整，阈值线要高于阴性对照或者基线噪音，通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期，不同通道需要设置相对独立的、合适的阈值线。

5) 结果分析

a. PC、NTC 和 NC 结果判断:

若反应体系中加入了 IC, 则各质控样品需要满足表 6 中条件:

表 6 PC、NTC 和 NC 结果判断

质控样本	FAM 信号	VIC 信号
PC	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线
NTC	Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线
NC	Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线

若反应体系中未加 IC: 各质控样品需要满足表 6 中 FAM 信号一列的条件, 无需分析 VIC 通道。

b. 待测样本 TS 检测结果判断:

前提条件: 判断样本 TS 检测结果前, 需要先判断各质控品即 PC、NTC 和 NC 是否通过表 6 中的标准。

若通过则可以进行下一步; 若未通过, 则样本 TS 的结果可能不可靠, 需要调查原因。

若反应体系中加入了 IC, 则根据样本 FAM 信号和 VIC 信号的结果找到表 7 中对应的结果判断:

表 7 待测样本结果判断 (加 IC 时)

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
Ct < 40, 且有明显的扩增曲线	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线	阳性
	Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	有抑制, 需要重复实验*
Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	Ct < 40, 且有明显的扩增曲线	阴性
	Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	有抑制, 需要重复实验*

*VIC 信号如果有抑制, 需重测或对样本进行合适处理消除抑制因子

若反应体系中未加 IC: 无需分析 VIC 通道, 只需要根据表 8 中样本 FAM 信号的结果找到对应的结果判断:

表 8 待测样本结果判断 (未加 IC 时)

FAM 信号	结果判断
Ct < 40, 且有明显的扩增曲线	阳性
Ct ≥ 40, 或无明显的起峰	阴性