

支原体 DNA 检测试剂盒(qPCR-荧光探针法)

产品描述

支原体 DNA 检测试剂盒按照 EP2.6.7 和 JPXVII 支原体检测相关标准进行验证,可用于检测主细胞库、工作细胞库、临床治疗用细胞和生物制品中是否存在支原体污染。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术, 参照 EP2.6.7 和 JPXVII 支原体检测相关要求进行了验证, 检测快速, 在 2h 内可完成检测工作, 专一性强。

订购信息

产品名称	货号	规格
支原体 DNA 检测试剂盒(qPCR-荧光探针法)	91-25-0013	100 Reactions

产品组分

组分	体积	包装
Buffer	2x750μl	透明管绿色盖
引物/探针混合物	400μl	棕色管
内控	2x1ml	透明管蓝色盖
阳性模板	1ml	透明管红色盖
无菌水	2x1ml	透明管

运输与保存

-20℃保存, 有效期 24 个月。

灵敏度和特异性

本试剂盒检测了 EP2.6.7 和 JPXVII 提到的 10 种支原体 10CFU 标准品 (MB 公司购买)灵敏度, 均可达到 10CFU/ml,另 EP2.6.7 和 JPXVII 中提到的 3 种支原体相关细菌检测结果均为阴性。符合 EP2.6.7 和 JPXVII

的相关灵敏度及特异性要求。

表 1.10 种支原体标准品检测结果

菌株	阳性/总数	菌株	阳性/总数
口腔支原体	24/24	关节液支原体	24/24
鸡毒支原体	23/24	精氨酸支原体	24/24
莱氏无胆甾原体	24/24	猪鼻支原体	24/24
发酵支原体	23/24	柠檬螺原体	24/24
肺炎支原体	24/24	唾液支原体	24/24

结果表明：支原体检测试剂盒检测各支原体标准品 10CFU/ml 浓度，检出比均大于 95%,符合欧洲及日本药典特异性及灵敏度要求。

表 2.三种支原体密切相关细菌检测结果

细菌名称	嗜酸乳杆菌	肺炎链球菌	丙酮丁醇梭菌
检测结果	阴性	阴性	阴性

结果表明：与支原体密切相关的 3 种细菌基因组检测结果为阴性，符合欧洲及日本药典特异性要求。

稳定性

支原体 DNA 检测试剂盒经过 5 次冻融测试，试剂盒性能不受影响。

测试仪器

CFX96(Bio-Rad)

操作方法

1. 配制预混液

1.1 将各试剂于冰上融解， Buffer 试剂上下颠倒轻轻混匀后轻微离心，其他试剂涡旋混匀后轻微离

心。

1.2 按照下列组分配制反应预混液：

表 3.预混液配制表

试剂组分	单孔用量
Buffer	15μl
引物/探针混合物	4 μl
内控	1μl
总体积	20μl

注：实验分为 1 个阳性组、1 个阴性组和 N 个实验组，每组应设 2 个重复，根据反应孔数计算所需的预混液总量。若实验组样品在 DNA 提取时已加入内控，则配制反应预混液时应将内控替换为无菌水。

2. 分装与加样

2.1 轻轻吹打混匀反应预混液，按 20 μl 每孔分装到 qPCR96 孔板中(阴性组排版时最好放在 A 行，并隔孔再加阳性组或实验组，降低污染的概率)；

2.2 按照下表分组，将对应的模板加入到反应孔底部(样品间注意更换枪头，避免污染)；

表 4.各反应孔加样示例

阴性组	10 μl 无菌水+20μl 预混液
阳性组	10 μl 阳性模板+20μl 预混液
实验组	10μl 待测样品+20μl 预混液

2.3 将 96 孔板用光学膜封板，轻微震荡混匀，快速离心后放入 qPCR 仪(避免徒手触摸光学膜)。

3.qPCR 程序设置

3.1 选择双通道水解探针法程序(FAM 为支原体检测通道, HEX 为内控检测通道)或根据不同仪器设置双通道检测, FAM 为支原体检测通道, HEX 为内控检测通道。

3.2 设置反应程序:

表 5.反应程序

阶段	预变性	变性	退火/延伸
温度	95℃	95℃	60℃
时间	2min	5s	35s
循环数	1	48	
检测	无	无	收集信号
反应体积	30μl		

4.qPCR 结果分析

不同仪器分析方法不同, 分析后先查看下扩增曲线形态是否正常。分析后根据以下表格参考判断实验结果:

表 6.结果分析标准

	FAM 信号	HEX 信号	判定结果
阴性组	CT $\geq$ 40 或无 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阴性
阳性组	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阳性
实验组	CT $\geq$ 40 或无 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阴性
		CT $\geq$ 40 或无 “S” 型扩增曲线	有抑制
	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阳性
		CT $\geq$ 40 或无 “S” 型扩增曲线	有抑制

注：如 HEX 信号有抑制，建议对样品进行基因组提取后再检测。

xin3io