

## MycoDetector

### 支原体 DNA 检测试剂盒说明书

#### ❖ 试剂盒简介

MycoDetector 支原体 DNA 检测试剂盒用于定性检测生物制药产品生产过程中细胞培养物及细胞培养过程中是否有柔膜细菌（包括支原体 Mycoplasma、甾原体 Acholeplasma、螺原体 Spiroplasma）污染。可用于检测的样品包括主细胞库、工作细胞库、病毒种子批、细胞收获液、原材料及临床治疗用细胞等；可检测到 180 余种柔膜细菌的 DNA 序列。

本试剂盒采用荧光探针法 qPCR 技术，检测方法快速、灵敏及特异性强，可在 2 h 内完成整个检测流程。该方法适用于任何能够检测报告基因 FAM™ 和 CY5™ 荧光的实时荧光定量 PCR 仪。内控质控 (Internal Control, IC) 可在 PCR 扩增反应阶段加入，用于判定检测样品对扩增反应是否存在抑制。

本试剂盒根据欧洲药典 EP2.6.7“支原体”以及 EP2.6.21“核酸扩增技术”的相关要求进行检测限、特异性以及耐用性的全面验证，满足欧洲药典 EP2.6.7 的要求，替代培养法检测限可达 10 CFU/mL，替代指示细胞法检测限可达 100 CFU/mL。

#### ❖ 产品组分及储存条件

试剂盒包括 50 个反应，未开封包装的保质期标注在包装标签上，试剂盒储存于 -15°C 到 -25°C。

表 1 试剂盒组分

| 产品组分                                     | 装量     | 管盖颜色 | 储存条件          |
|--|--------|------|---------------|
| 支原体检测反应缓冲液<br>Mycoplasma Reaction Buffer | 500 μL | 红色   | -15 °C~ -25°C |
| 引物和探针混悬液<br>Primer & Probe Mix           | 250 μL | 棕色管  | -15 °C~ -25°C |
| 阳性质控 Positive Control *                  | 300 μL | 蓝色   | -15 °C~ -25°C |
| 内部质控 Internal Control                    | 100 μL | 绿色   | -15 °C~ -25°C |
| DNA 稀释缓冲液<br>DNA Diluted Buffer          | 1 mL   | 透明色  | -15 °C~ -25°C |

\* 阳性质控浓度为 100 copies/μL。

#### ❖ 用户提供的耗材及设备

- 用于检测 FAM™ 和 Cy5™ 荧光的 qPCR 仪，如 ABI 7500 Fast;
- 涡旋仪
- 移液枪及吸头 (10 μL、100 μL 和 1000 μL)
- 1.5 mL 的无核酸反应管
- qPCR 反应管或 96 孔板

#### ❖ 操作步骤

##### ● qPCR 反应液的准备

1、根据样品数量计算所需反应孔数，一般做 2 个复孔。

总反应孔数= (待测样品数+无模板对照 NTC+阴性提取质控 NEC+阳性提取

对照 PEC+阳性质控 PC) × 2 + 2 (2 个复孔的损失率)

注：阴性提取质控 NEC (Negative Extraction Control, NEC) 为 DNA 提取时所使用的阴性对照样品进行 DNA 提取的产物。

阳性提取质控 PEC (Positive Extraction Control, PEC) 为 DNA 提取时所使用的阳性对照样品进行 DNA 提取的产物。

无模板对照 NTC (No Template Control, NTC) 为 DNA 稀释缓冲液

阳性质控 PC (Positive Control, PC) 为试剂盒中的阳性质控

2、将支原体检测反应缓冲液、引物和探针混悬液、阳性质控、内部质控，放置冰上融化。

##### ● 单孔反应混合液的配置

按照以下试剂用量配制单孔反应液。

表 2 单孔反应混合液配制表

| 组分                         | 单孔用量  |
|----------------------------|-------|
| 支原体检测反应液缓冲液                | 10 μL |
| Mycoplasma Reaction Buffer |       |
| 引物和探针混悬液                   | 5 μL  |
| Primer & Probe Mix         |       |
| 内部质控                       | 1 μL  |
| Internal Control           |       |
| 总体积                        | 16 μL |

##### ● 加样

1、按照以下用量加入待检测、对照及质控样品

表 3 单孔反应混合液加入样品量配制表

| 反应混合液         | 样品              | 总体积   |
|---------------|-----------------|-------|
|               | 4 μL 待测样品 TS    | 20 μL |
|               | 4 μL 无模板对照 NTC  | 20 μL |
| 16 μL 上述反应混合液 | 4 μL 阴性提取质控 NEC | 20 μL |
|               | 4 μL 阳性提取质控 PEC | 20 μL |
|               | 4 μL 阳性质控 PC    | 20 μL |

注意：每个样品一般至少做 2 个复孔，也可根据需要增加。

2、将上述总体积 20 μL 的加样反应液加入至 96 孔板或者 qPCR 反应管中，可参考下表中的 96 孔板排版示例 (以 3 个样品为例)：

表 4 96 孔板排版示例

|   |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
|---|-----|-----|---|---|-----|-----|---|---|-----|-----|----|----|
| A | NTC | NTC |   |   | TS1 | TS1 |   |   | PC  | PC  |    |    |
| B | NEC | NEC |   |   | TS2 | TS2 |   |   |     |     |    |    |
| C |     |     |   |   | TS3 | TS3 |   |   | PEC | PEC |    |    |
| D |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
| E |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
| F |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
| G |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
| H |     |     |   |   |     |     |   |   |     |     |    |    |
|   | 1   | 2   | 3 | 4 | 5   | 6   | 7 | 8 | 9   | 10  | 11 | 12 |

注：TS1、TS2、TS3 分别是 3 个待测样品。

3、将 96 孔板用光学膜封闭或者 qPCR 反应管盖上管盖，轻微震荡混匀后并快速离心 10 sec，放入 qPCR 仪。

##### ● qPCR 反应程序参数设置

以 ABI 7500 Fast 为例：

1、在 Setup 下的 Plate Setup 面板中，创建 FAM 探针，选择荧光报告基因为 FAM，荧光猝灭基因为 none；创建 CY5 探针，选择荧光报告基因为 CY5，

荧光猝灭基团为 none;

选择检测参比荧光为 ROX (可选择);

2、在 Setup 下的 Plate Setup 面板中, 在 sample name 一栏中分别命名为 NTC、NEC、PEC、PC、TS1、TS2、TS3。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性提取质控 NEC 孔、待测样品 TS 孔、阳性提取对照 PEC 孔、阳性对照 PC 孔设置为 Unknown;

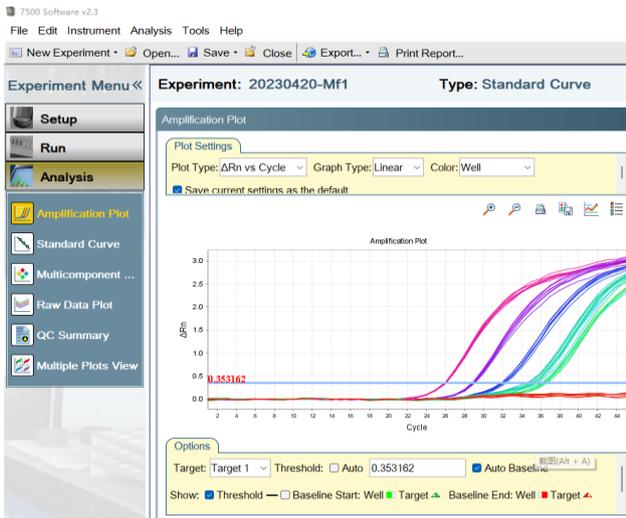
3、在 Setup 下的 Run Method 面板中, 设置反应程序如下表: Volume 选择 20  $\mu\text{L}$ 。保存设置, 点击“START”按钮开始 qPCR 反应程序。

表 5 qPCR 反应程序

|                  |       |        |
|------------------|-------|--------|
| 预变性              | 95 °C | 5 min  |
| 循环反应 (45 cycles) | 95 °C | 10 sec |
|                  | 60 °C | 30 sec |

## ❖ 结果分析

1、在 Analysis 下的 Amplification Plot 面板中, 系统会自动给出阈值线“Threshold”, 有时阈值线接近于基线, 导致 Ct 值相差较大, 此时可选择 Auto Baseline, 手动调节阈值线“Threshold”并点击 Analyze, 可初步查看扩增曲线的形态是否正常。



2、根据 Analysis 下的 Amplification Plot 面板下“View Well Table”中“CT”一栏的结果数值进行判定, 结果判定的标准如下表 6 和表 7:

### a. 质控结果分析

表 6 质控结果判定

| 质控样品 | FAM 通道                | CY5 通道                |
|------|-----------------------|-----------------------|
| 阳性对照 | Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 | Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 |
| 阴性对照 | Ct ≥ 40 或扩增曲线无明显起峰    | Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 |

### b. 待测样品检测结果

表 7 支原体样品检测结果判定

| FAM 通道                | CY5 通道                | 结果判断 |
|-----------------------|-----------------------|------|
| Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 | Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 | 阳性   |
| Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 | Ct ≥ 40 或扩增曲线无明显起峰    | 有抑制  |
| Ct ≥ 40 或扩增曲线无明显起峰    | Ct < 40 且有有效的“S”型扩增曲线 | 阴性   |
| Ct ≥ 40 或扩增曲线无明显起峰    | Ct ≥ 40 或扩增曲线无明显起峰    | 有抑制  |

## 【注意事项】:

- 1、使用本试剂盒前请仔细阅读说明书, 实验应规范操作, 包括样品预处理、样品提取以及样品检测。
- 2、试剂融化、加样和配液应在冰上操作。
- 3、每个试剂组分使用时应轻微震荡混匀并快速离心。
- 4、为避免样品之间的交叉污染, 阴性提取对照与支原体样品分区操作; 加样时应先加阳性对照, 再加待测样品及阳性质控样品, 并及时封盖。
- 5、建议使用无菌低吸附带滤芯枪头。

## ❖ 操作流程

