

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成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团 FAM™ 和 Cy5™ 荧光的实时荧光定量 PCR 仪。内控质控可在 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 -18℃ 及以下。

产品组分	装量	管盖颜色	储存条件
支原体检测反应缓冲液 Mycoplasma Reaction Buffer	500 μL	红色	-18℃ 及以下
引物和探针混悬液 Primer & Probe Mix	250 μL	棕色管	-18℃ 及以下, 避光
阳性质控 Positive Control	300 μL	蓝色	-18℃ 及以下
内部质控 Internal Control	100 μL	绿色	-18℃ 及以下
DNA 稀释缓冲液 DNA Diluted Buffer	1 mL	透明色	-18℃ 及以下

* 阳性质控浓度为 10000 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
- 移液枪及枪头 (10 μ L、100 μ L 和 1000 μ L)
- 1.5 mL 的无核酸反应管
- qPCR 反应管或 96 孔板

❖ 操作步骤

1. 在 PCR 反应管中配置如下混合液：

支原体检测反应液缓冲液 Mycoplasma Reaction Buffer	10 μ L
引物和探针混悬液 Primer & Probe Mix	5 μ L
内部质控 Internal Control	1 μ L
总体积	16 μ L

* 根据样本数量计算所需反应孔数，一般做 2 个复孔。

2. 加入待检测及对照样品

反应液	样品	总体积
16 μ L 上述反应混合液	4 μ L 待测样品 Sample	20 μ L
	4 μ L 阳性质控 Positive Control	20 μ L
	4 μ L 阴性质控 Negative Control	20 μ L

* DNA 稀释缓冲液作为阴性质控。

3. 操作方法

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，短时间快速离心 10 sec，放入 qPCR 仪。

4. qPCR 反应程序参数设置

以 ABI 7500 Fast 为例：

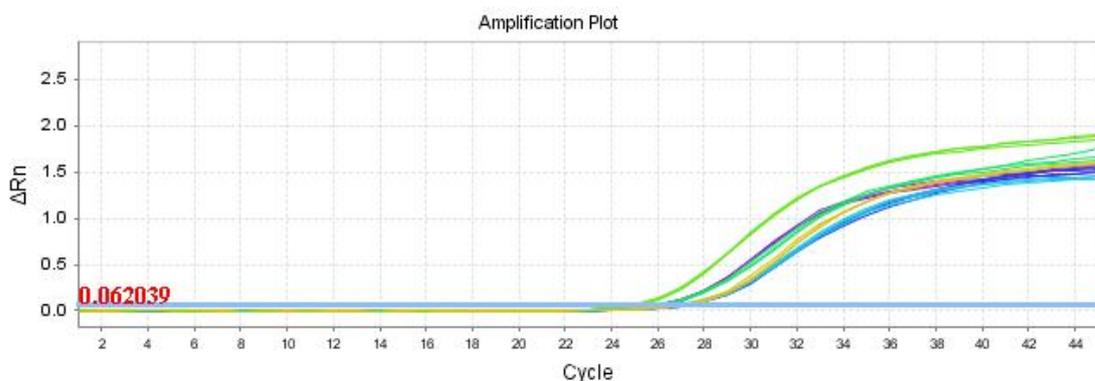
- a. 创建 FAM 探针，选择荧光报告基团为 FAM，荧光猝灭基团为 none；创建 Cy5 探针，选择荧光报告基团为 Cy5，荧光猝灭基团为 none；选择检测参比荧光为 ROX（可选择）。

b. 设置反应程序：volume 选择 20 μ L。

预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min
循环反应 (45 cycles)	95 $^{\circ}$ C	10 sec
	60 $^{\circ}$ C	30 sec

❖ 结果分析

1. 在 Analysis 下的 Amplification Plot 面板中，设置阈值线，选择 Auto Baseline，点击 Analyze，可初步查看扩增曲线的形态是否正常。



2. 检测结果判定

a. 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	CY5 信号
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 \geq 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

FAM 信号	CY5 信号	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 \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制
Ct \geq 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 \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制

❖ 操作流程简图

