

# MycAway<sup>®</sup> Mycoplasma Real-time qPCR Detection Kit (2G)

## 支原体 qPCR 检测试剂盒（探针法）(2G)

### 产品简介

MycAway<sup>®</sup>支原体 qPCR 检测试剂盒(探针法)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 CY5，分别检测目标序列和内参。其可覆盖 183 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 $\leq 10$  CFU/mL 的要求，具备灵敏度高、特异性好、安全性好等特点。

本产品能够与利用手动提取方法的 MolPure<sup>®</sup>磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒（Cat#18461ES）搭配使用。样本中的核酸同样也可以使用 Auto-Pure 32A 全自动核酸提取仪（Cat#80501ES）和 MolPure<sup>®</sup>磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒 FA(预封装)（Cat#18462ES）自动提取样本核酸（请注意，试剂盒货号 Cat#18461ES 和 Cat#40619ES 都已经过完全验证，如需详细验证信息，可以联系我司技术支持）。样本经过前处理去除干扰杂质获得纯化的支原体 DNA 后，使用 qPCR 仪进行 qPCR 反应后收集探针的荧光信号，从而对检测结果进行分析。

### 产品信息

货号	40619ES25 / 40619ES60
规格	25 T / 100 T

### 组分信息

组分编号	组分名称	40619ES25	40619ES60
40619-A	2×MyqPCR Reaction Buffer	375 $\mu$ L	1.5 mL
40619-B	MyPrimer & Probe Mix	100 $\mu$ L	400 $\mu$ L
40619-C <sup>*</sup>	内部对照 (IC)	25 $\mu$ L	100 $\mu$ L
40619-D <sup>**</sup>	阳性对照 (PCS)	250 $\mu$ L	1 mL
40619-E <sup>***</sup>	DNA 稀释液	500 $\mu$ L	2×1 mL
40619-F	DEPC 水	500 $\mu$ L	2×1 mL

<sup>\*</sup>内部对照 (IC) : Internal control;

<sup>\*\*</sup>阳性对照 (PCS) : Positive control solution, 浓度为 1,000 copies/ $\mu$ L;

<sup>\*\*\*</sup>DNA 稀释液: 用于样本和 IC 稀释, 以及 NTC 和 NCS 的模板。

### 储存条件

-25~-15°C保存, 有效期 2 年。

\*收到货后, 请检查各组分是否齐全, 如不立即开封各组分做实验, 需立即放入-25~-15°C中保存。注意 40619-B 需要避光保存。

### 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. SLAN: 96S;
- b. Thermo Scientific: 7500 Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5;
- c. Roche: LightCycler® 480.

## 2. 实验方法

### 1) 待测样本 DNA 提取

建议使用 Yeasen 的“磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒”提取样本 DNA, 产品货号为 Cat#18461ES (用于手动提取) 和 Cat#18462ES (用于自动提取), 您可以在翌圣官网 (<https://www.yeasen.com>) 查询该产品的详细信息和购买该产品。

### 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(PCS)<sup>1</sup>、无模板对照(NTC)<sup>2</sup>、抽提阴性对照(NCS)<sup>3</sup>和待测样本(TS)<sup>4</sup>, 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。

<sup>1</sup>阳性对照 (PCS) : Positive control solution;

<sup>2</sup>无模板对照 (NTC) : No template control;

<sup>3</sup>抽提阴性对照 (NCS) : Negative control solution;

<sup>4</sup>待测样本 (TS) : Test sample.

<sup>5</sup>PCS 和 NTC 为无需进行提取前处理的样本; NCS 和 TS 为需要进行提取前处理的样本。

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

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室温融化。

c. 根据实验设计和反应孔数计算所需要的 qPCR Mix 的量。

**若用户不做对照样品, 则在计算反应孔数的时候进行相应删减即可。**

组分	体积
2× MyqPCR Reaction Buffer	15 μL
MyPrimer & Probe Mix	4 μL
内部对照 (IC)	1 μL
Total	20 μL

表 1 qPCR Mix 体系

### SLAN 仪器所用体系

组分	体积
2× MyqPCR Reaction Buffer	15 μL
MyPrimer & Probe Mix	2 μL
内部对照 (IC)	1 μL
DEPC 水	2 μL
Total	20 μL

表 2 SLAN 仪器 qPCR Mix 体系

### 3) 加样

a. 充分震荡混匀 qPCR Mix, 低速离心, 将管盖残留液体收集至管底。

b. 向每孔反应管中分装 20 $\mu$ L 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”中配制的 qPCR Mix 保持一致，与样品一一对应，避免加错。

c. 向已分装过 qPCR Mix 的反应管中加入样品。

样本	每管或孔中总反应液 30 $\mu$ L**
TS	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L 待测样本纯化液
NTC	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L DNA 稀释液
NCS*	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L NCS 纯化液
PCS	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L 阳性对照

表 3 加样示例\*\*

\*NCS 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，如有气泡，排尽气泡后低速离心，不需振荡混匀。

#### 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 (~70 min 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（CY5），选择报告荧光基团为 CY5，猝灭荧光基团为 None。在“Plate Setup”的“Assign Targets and Samples”中，选择“None”。

c. 标准扩增程序设置：

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	

表 4 标准扩增程序

d. 基线和阈值设置：

**基线调整原则：**仪器默认基线。

**阈值设置原则：**Thermo Scientific: 7500 Real-Time PCR System 仪器阈值线手动设置为 50000。其他仪器类型不需要进行阈值线调整，用仪器默认参数。

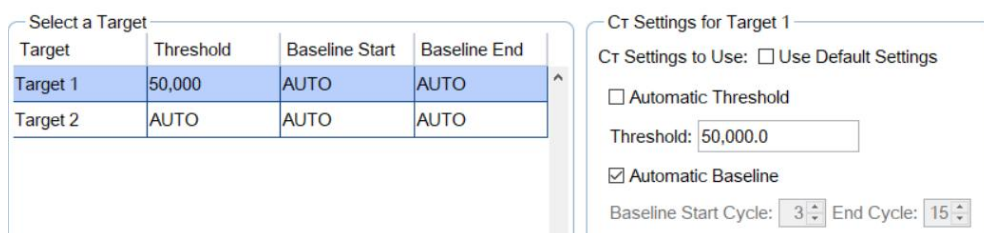


图 1 7500 基线阈值线参数

## 5) 结果分析

### a. PCS、NTC 和 NCS 结果判断:

质控样本 <sup>*</sup>	FAM 信号	CY5 信号
PCS	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
NCS	Ct≥40, 或无明显的起峰	Ct<40, 且有明显的扩增曲线

表 5 PCS、NTC 和 NCS 结果判断

<sup>\*</sup>若各样品进行 2 重复以上检测, 则每个重复孔都需要满足上述条件, 如果有个别孔不满足, 建议调查原因后重新测试。

### b. 待测样本 TS 检测结果判断:

前提条件: 判断待测样本 TS 检测结果前, 需要先判断各质控品即 PCS、NTC 和 NCS 是否通过表 4 中的标准。若通过则可以进行下一步; 若未通过, 则待测样本 TS 的结果可能不可靠, 需要调查原因。

FAM 信号	CY5 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	结果为阳性, 但反应体系存在抑制情况 <sup>*</sup>
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	无法判断结果的阴阳性, 且反应体系存在抑制情况 <sup>*</sup>

表 6 待测样本结果判断<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>CY5 信号如果有抑制, 如需要, 建议调查并对样本进行合适处理消除抑制因子后重测。

<sup>\*\*</sup>若各样品进行 2 重复以上检测, 则每个重复孔都需要满足上述条件, 如果有个别孔不满足, 建议调查原因后重新测试。

## 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) 本产品仅作科研用途。