

# MycAway® 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®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®磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒（Cat#18461ES）搭配使用。同样也可以使用 48 通道自动化核酸提取仪（Cat#80511ES）和 MolPure®磁珠法 48 孔样本前处理试剂盒 FN（预封装）（Cat#18467ES）自动化的提取样本核酸（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#18467ES (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。

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

**提取前加入 IC:** 如果使用该试剂盒用于产品放行等 GMP 活动中, 则推荐向 NCS 和 TS 这些需要进行提取前处理的样本中先加入 IC, 再进行提取操作。然后, 无需在配制 qPCR Mix 时再加入 IC。提取前加 IC 的方法: 向每个待测的 100μL 样本 (NCS 或者 TS) 中加入 1uL IC, 然后进行提取操作, 最终取 10uL NCS 纯化液样本或者待测样本纯化液作为模板, 加入 qPCR 反应体系中。

**提取后加入 IC:** 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 NCS 和 TS 中的, 则需要在配制 qPCR Mix 时再加入 IC。提取后加 IC 的方法: 仅在配制 qPCR Mix 体系阶段, 向每个 qPCR 反应体系中加 1μL IC。

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 (提取前加 IC) | 体积 (提取后加 IC) |
|---------------------------|--------------|--------------|
| 2× MyqPCR Reaction Buffer | 15 μL        | 15 μL        |
| MyPrimer & Probe Mix      | 4 μL         | 4 μL         |
| 内部对照 (IC)                 | 0            | 1 μL         |
| DEPC 水                    | 1 μL         | 0            |
| Total                     | 20           | 20 μL        |

表 1 qPCR Mix 体系

SLAN 仪器所用体系

| 组分                        | 体积 (提取前加 IC) | 体积 (提取后加 IC) |
|---------------------------|--------------|--------------|
| 2× MyqPCR Reaction Buffer | 15 μL        | 15 μL        |

|                      |            |            |
|----------------------|------------|------------|
| MyPrimer & Probe Mix | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  |
| 内部对照 (IC)            | 0 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L  |
| DEPC 水               | 3 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  |
| Total                | 20 $\mu$ L | 20 $\mu$ L |

表 2 SLAN 仪器 qPCR Mix 体系

### 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 $\mu$ 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。**
- 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 <sup>**</sup>       |
|------------------|--|
| 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 <sup>*</sup> | 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<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>NCS 推荐使用 DNA 稀释液作为样本进行前处理。

<sup>\*\*</sup>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。

<sup>\*\*\*</sup>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<sup>®</sup> 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 $^{\circ}$ C | 5 min  | 1   |
| 2  | 变性             | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec | 45  |
| 3  | 退火/延伸 (荧光信号收集) | 62 $^{\circ}$ 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。

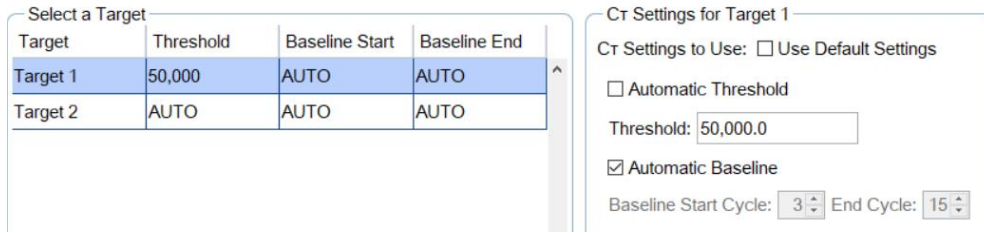


图 1 7500 基线阈值线参数

## 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。