



产品使用说明书

Rhinogen[®] Myco-Acid[™] qPCR 支原体检测试剂盒

货号：RA-MT05



目 录

| | |
|--------------------|---|
| 目 录 | 1 |
| 产品信息 | 2 |
| 试剂包装 | 2 |
| 保藏条件 | 2 |
| 产品综述 | 3 |
| 背景 | 3 |
| 概述 | 3 |
| 操作方法 | 4 |
| 适用机型 | 4 |
| 所需设备 | 4 |
| qPCR 反应体系的准备 | 4 |
| qPCR 反应的加样 | 4 |
| qPCR 仪运行程序设置 | 4 |
| qPCR 结果分析 | 5 |
| 相关产品 | 6 |
| 联系我们 | 7 |

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Myco-Acid™ qPCR支原体检测试剂盒包装规格如下:

| 试剂组分 | 货号 | 规格 |
|-----------------|----------|-------|
| | | 50 T |
| qPCR Master Mix | RA-MT05A | 430μl |
| 引物探针混合液 | RA-MT05B | 110μl |
| 内部质控 (IC) | RA-MT05C | 600μl |
| 阳性质控 (PC) | RA-MT05D | 300μl |
| DNA 稀释液 | RA-MT05E | 300μl |

保藏条件 采用干冰运输, 收到产品后请立即置于-18℃及以下条件下储存, 有效期为12个月。
注: 引物探针混合液 (货号: RA-MT05B) 请于-18℃及以下避光存储。

产品综述

背景

支原体（Mycoplasma）是对支原体科、无胆甾原体科和螺原体科的原核微生物总称，是已知可以自由生活的最小生物，没有细胞壁，形状多样可变，直径一般是 0.1~0.3 μm ，基因组A-T 含量高，对常见的抗生素不敏感，对热敏感。目前已从污水、植物、动物、禽类、昆虫、人、温泉或其他高温环境中发现 200 种左右支原体。

细胞如果受到支原体污染，细胞生长速度变慢，细胞产生病变或形态改变。连续培养细胞污染的概率大约15~35%，主要来源于 20 多种支原体，包括口腔支原体（*M. orale*）、肺炎支原体（*M. pneumoniae*）、发酵支原体（*M. fermentans*）、精氨酸支原体（*M. arginini*）、莱氏无胆甾原体（*A. laidlawii*）和猪鼻支原体（*M. hyorhinae*）。

人员操作、污染的细胞、原辅料（血清、胰酶、培养基），实验环境污染（生物安全柜、细胞间，培养箱）、实验仪器（水浴锅、液氮罐）、实验耗材（培养皿、方瓶、细胞工厂）都可能是污染源。污染了的细胞一方面对生产带来巨大影响，另外如果细胞产品、蛋白产品、病毒类产品受到支原体污染，最终会给患者带来潜在的健康风险。因此，监管部门要求企业对细胞库，检定用细胞和产品进行支原体检测，从源头上进行控制，尽早发现，确保放行产品不含支原体。对此，全球各国药物监管部门也发布了支原体检测相关指南，检测方法主要包括荧光染色法、培养法、生化检测方法和核酸扩增法。

概述

Rhinogen[®] Myco-Acid[™] qPCR支原体检测试剂盒利用Taqman 荧光探针原理，于定性检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批以及临床治疗用细胞中是否有支原体污染。

操作方法

- 适用机型**
- ✓ 7500 Real-Time PCR System(AB)
 - ✓ StepOne Plus Real-Time PCR System(AB)
 - ✓ 7300 Plus Real-Time PCR System(AB)
 - ✓ QuantStudio 3 Real-Time PCR System(AB)
 - ✓ QuantStudio 5 Real-Time PCR System(AB)
 - ✓ 耶拿荧光定量 PCR 仪 qTOWER3 系列
 - ✓ SLAN 96S
 - ✓ LineGene9600(博日)
- 注：其他机型可以按照本说明书试用。如有问题，请咨询本公司。

- 所需设备**
- ✓ 荧光定量PCR仪
 - ✓ 掌上离心机
 - ✓ 涡旋混合仪

- qPCR 反应体系的准备**
- 1、根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数，建议每个样品做2个重复测试：
反应孔数=（1个阳性质控PC+1个无模板对照BLK+1个阴性质控NCS+N个待测样品）×2
 - 2、根据反应孔数计算本次所需的qPCR Master Mix 和引物探针混合液的总量：
qPCR Master Mix 用量=（反应孔数+2）×8 μl
引物探针混合液用量=（反应孔数+2）×2 μl
 - 3、各试剂置于室温融化后，将所需用量将引物探针混合液与qPCR Master Mix 混合，配制所需要的反应混合液，轻微振荡混匀，快速离心5秒，然后按照下表所示加样：

| 反应孔 | 加样 |
|------------|-------------------------|
| 阳性质控（PC） | 10μl反应混合液+ 20μl阳性质控（PC） |
| 无模板对照（BLK） | 10μl 反应混合液+ 20μlDNA 稀释液 |
| 阴性对照（NCS） | 10μl反应混合液+ 20μlNCS 纯化液 |
| 待测样品 | 10μl 反应混合液+ 20μl待测样本纯化液 |

- qPCR 反应的加样**
- 1、取96孔PCR板，在所需各孔内先加入10μl反应混合液；
 - 2、然后向孔内分别加入BLK、NCS、PC、和样品；
 - 3、粘性膜封板，离心，确保试管中无气泡，待测。

- qPCR 仪运行程序设置**
- 以AB公司7500 qPCR 仪、软件版本2.0 为例：
- 1、创建新运行程序，实验类型选择Quantitation—Standard Curve，试剂类型选择TaqMan；
 - 2、选择检测探针，通道1：荧光报告基因为FAM，荧光淬灭基因为none；通道2：荧光报告基因为VIC，荧光淬灭基因为none；
 - 3、检测参比荧光为ROX；
 - 4、按照下表完成扩增程序设置：

| 步骤 | 循环数 | 温度 | 时间 | 荧光采集 |
|----|-----|------|------|------|
| 1 | 1 | 37°C | 2min | |

| | | | | |
|---|----|------|------|------|
| 2 | 1 | 95°C | 5min | |
| 3 | 5 | 95°C | 15s | |
| | | 62°C | 1min | |
| 4 | 40 | 95°C | 15s | |
| | | 62°C | 1min | 采集荧光 |

qPCR 结果分析

- 1、在Results的Amplification Plot面板中，将Threshold设置为0.1，Baseline设置为Auto，点击Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常；
- 2、PC、NTC、NCS检测结果判定：

| 质控品 | FAM通道 | VIC通道 |
|-------------|------------------|------------------|
| 阳性质控 (PC) | 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 | 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 |
| 阴性对照 (NCS) | 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥35 | 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 |
| 无模板对照 (BLK) | 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥35 | 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥35 |

- 3、待测样品检测结果判定：

| FAM通道 | VIC通道 | 结果判定 |
|------------------|------------------|-----------|
| 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 | 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 | 阳性 |
| | 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥3 | 需复测 |
| 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥35 | 扩增曲线呈“S”型且Ct值<35 | 阴性 |
| | 扩增曲线无明显起峰或Ct值≥3 | 结果不可靠，需复测 |

注：如遇特殊结果难以判断，请联系RhinoBio，协助完整结果分析。

相关产品

| 产品名称 | 货号 |
|-------------------------------|---------|
| MycoAlarm™ 支原体检测试剂盒 | RA-MT01 |
| Myco-Visal™ 一步法快速支原体检测试剂盒 | RA-MT03 |
| Myco-Acid™ PCR 支原体检测试剂盒 | RA-MT04 |
| Myco-EXT™ 支原体DNA提取纯化试剂盒（磁珠法） | RA-MT06 |
| Myco-EXT™ 支原体DNA自动化提取试剂盒（非预装） | RA-MT07 |
| Myco-EXT™ 支原体DNA自动化提取试剂盒（预装） | RA-MT08 |

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - 技术支持：techserv@rhinobio.com
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

