



支原体qPCR检测试剂盒说明书

产品信息

货号	规格
EDY020-01	50T
EDY020-02	100T

产品概述

支原体 qPCR 检测试剂盒旨在通过实时荧光定量 PCR 技术对从细胞悬液中提取的支原体 DNA 进行检测。为了拓展检测物种的范围,试剂盒中的引物和探针是针对支原体16S rRNA 基因的特定区域进行精心设计的。检测范围覆盖22种细胞培养过程中的常见支原体,以及大肠杆菌和肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 从而避免交叉反应,检测限度低至10 Copies。

产品组分

试剂盒成分	50T	100T
Myco-Probe Mix	50 μ L	100 μ L
Myco-Primer Mix	50 μ L	100 μ L
Positive Control DNA (1×10^7 Copies/ μ L)	20 μ L	40 μ L
2 $\times$ Probe qPCR Mix	50 μ L	100 μ L
Nuclease-free Water	1 mL	2 $\times$ 1 mL
Nuclease-free Water	50 μ L	100 μ L





► 运输与保存方式

冰袋运输; -20℃保存, 12 个月有效期。

► 实验流程介绍

1. 实验注意事项

(1) 探针和引物容易被核酸酶降解, 如果降解, 就不能提供准确的检测。小心避免在样品处理过程引入的汗液或唾液造成的核酸酶污染。

(2) 建议指定并物理隔离下述 3 个区域, 用于反应混合物制备和检测。避免在任何这些区域打开/关闭含有扩增产物的试管。

2. 操作区域

本试剂盒中使用的PCR 反应是一种非常灵敏的扩增方法。为避免PCR 产物和对照模板的交叉污染, 建议通过划分不同工作区域进行实验。区域划分可参照图2 进行。

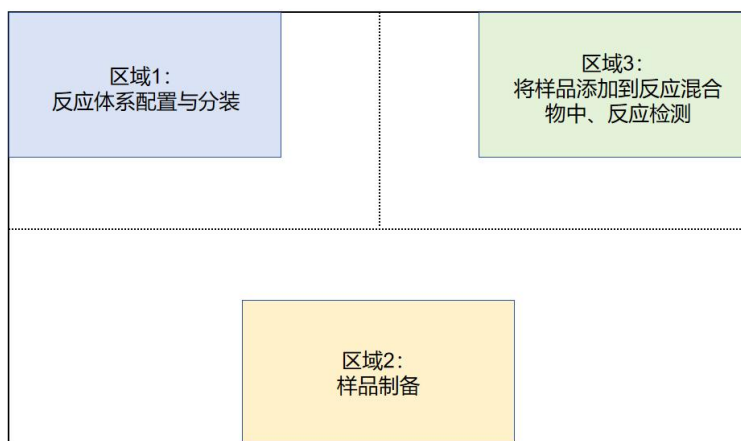


图1 实验区域划分参考

注: 根据实验环境决定是否设置超净工作台





3.1 样品处理

1. 取100 μL 细胞上清（培养24 h以上）1.5 mL至离心管；
2. 消化传代细胞时，取适量细胞（细胞数目 $\geq 1 \times 10^5$ ）至同一1.5mL离心管中，务必保证细胞数量；
3. 向样品中（100 μL ）加入1 μL Proteinase K；
4. 涡旋振荡混匀后，55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min；
5. 孵育完成后，98 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 min以灭活Proteinase K；
6. 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持30 min确保样品冷却后瞬时离心后加样。

3.2 qPCR 反应体系的配制

1. 根据表1试剂组分（试剂置于冰上）配制反应混合样，为了确保有足够的混合样，最低需要多加约10% 的量，每个反应3个技术重复。（在区域1操作）

表1 支原体检测反应体系 (20 μL)

组分	每孔体积 (μL)
Probe qPCR Mix	10
Myco-Primer Mix (10 μM)	1
Myco-Probe	1
Nuclease-free Water	6
Total	18

2. 将反应混合物充分混匀后分装到 qPCR 反应管中，18 μL 每管。（在区域1操作）
3. 将阴性对照（Nuclease-free Water）、待测样品（“4.1”处理的细胞样品）、阳性对照模板（Positive Control Template）分别加入到 qPCR 反应管。先加阴性对照，再加检测样品，最后加入 Positive Control，防止被污染。（在区域3操作）
4. 短暂离心后，按照表2所示程序进行 qPCR 反应。

表2 qPCR 扩增程序

	温度	时间
污染消化	37 $^{\circ}\text{C}$	2 min
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
40个循环	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
	58.5 $^{\circ}\text{C}$	30 sec（信号采集）

荧光检测通道选择：支原体探针的荧光基团是FAM，检测通道为FAM。



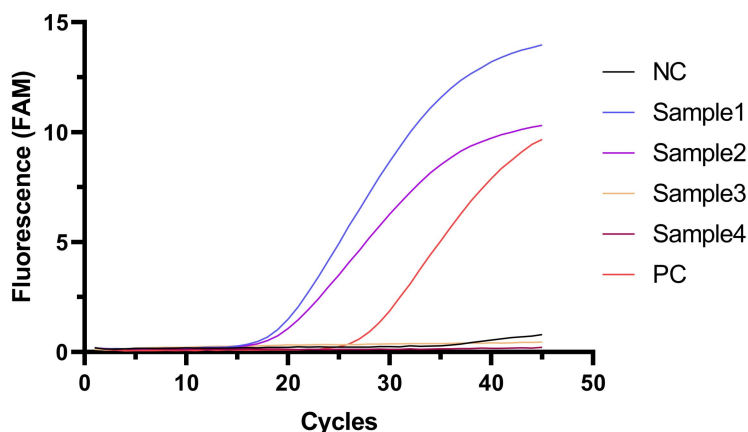
5. 结果判断

5.1 结果判读标准

表3 检测结果判读标准

样品	FAM 信号	结果判读
阳性对照	Ct<35, 有明显扩展曲线	阳性结果正常
阴性对照	Ct≥35, 无明显起峰	阴性结果正常
样品1	Ct<35, 有明显扩展曲线	支原体阳性
样品2	Ct≥35, 无明显起峰	支原体阴性

5.2 实验案例展示



图中阳性对照 (PC) Ct<35, 有明显扩展曲线, 阴性对照 (NC) Ct≥35, 无明显起峰;

Sample1 和 Sample2 的 Ct<35, 有明显扩展曲线, 表明支原体检测阳性;

Sample3 和 Sample4 的 Ct≥35, 无明显起峰, 表明支原体阴性。

► 注意事项

- (1) 本产品仅供实验室作为科研目的使用, 请严格遵守相关法律法规和伦理要求, 否则产生一切后果与本公司无关。
- (2) 请按要求运输、存储及使用试剂, 非必要请勿反复冻融, 因未按要求保存、操作造成的实验失败, 本公司概不负责。

