

EZ-Probe Mycoplasma Detection Kit (ROX2)

说明书

Cat. No.: EZ3605-R2

一、产品简介

EZ-Probe Mycoplasma Detection Kit (ROX2)是用于进行快速检测支原体的试剂盒。本试剂盒采用探针法 qPCR 原理，使用特殊设计的 qPCR 引物和探针进行支原体检测，能够以高特异性检测 > 90 种支原体，且与密切相关的菌种无交叉反应性，经验证符合《欧洲药典》中的要求。本试剂盒的最低检测限可以达到 10 CFU/ml 级别（须进行样品核酸提取）。在常规检测中，本试剂盒可直接以细胞培养上清为模板免提取进行检测；也可与支原体检测样本核酸提取试剂盒（Cat.: EZ3604）配套使用，从而获得更低的检测下限。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZ3605-R21 (50 Rxns, 30 µl/Rxn)	EZ3605-R22 (100 Rxns, 30 µl/Rxn)	EZ3605-R23 (5,00 Rxns, 30 µl/Rxn)
2× Mycoplasma qPCR Reaction Mix (ROX2) ^{*1}		750 µl × 1 tube	1.5 ml × 1 tube	1.5 ml × 5 tubes
Mycoplasma qPCR Primer/Probe Mix ^{*2}		150 µl × 1 tube	300 µl × 1 tube	300 µl × 5 tubes
Mycoplasma Positive Control		170 µl × 1 tube	340 µl × 1 tube	340 µl × 5 tubes
Mycoplasma Internal Control		100 µl × 1 tube	200 µl × 1 tube	200 µl × 5 tubes
DNA Dilution Buffer		500 µl × 1 tube	1 ml × 1 tube	1 ml × 5 tubes

注：*1. 包含热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、低浓度的 ROX2 及高度优化的缓冲液体系；*2. 包含特异性的引物和探针。

三、保存条件

本试剂盒于-20°C 避光可保存 12 个月，过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、适用的仪器型号（如果仪器不在下表中，请使用 EZ3605-R1）

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 1, 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Aligent AriaMx, Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cycler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、注意事项

- 使用前，将各个组分从-20°C 冰箱中取出，室温放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 10 次使之充分混匀（非常重要），然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上备用。
- 配液和加样步骤尽量都在冰上操作。

六、操作步骤

1. 预混液的制备

1.1 使用前, 将 2× Mycoplasma qPCR Reaction Mix (ROX2)、Mycoplasma qPCR Primer/Probe Mix、Mycoplasma Positive Control、Mycoplasma Internal Control 和 DNA Dilution Buffer 从冰箱中取出, 冰上放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化, 上下颠倒 10 次使之充分混匀 (非常重要), 然后使用离心机短暂离心至管底, 放在冰上备用。

1.2 按照如下表格进行预混液的配制:

成分	体积
2× Mycoplasma qPCR Reaction Mix (ROX2)	15 µl
Mycoplasma qPCR Primer/Probe Mix	3 µl
Mycoplasma Internal Control	2 µl
预混液总体积	20 µl

1.3 预混液混匀后离心, 用移液器分装到 96 孔 qPCR 板中, 每个反应需预混液 20 µl, 配置多个反应时各组分用量应上浮作为移液误差。

2. qPCR 反应体系的配制与加样

准备好细胞培养上清 (5 ~ 10 µl) 或提取产物 (10 µl) 后按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制:

反应孔名称	各组分用量
阴性对照 (Negative control reaction, NC)	20 µl 预混液 + 10 µl DNA Dilution Buffer
阳性对照 (Positive control reaction, PC)	20 µl 预混液 + 10 µl Mycoplasma Positive Control
待测样品 (unknown sample reaction, S)	20 µl 预混液 + (5 ~ 10 µl) 待测样品, 加水补足到 30 µl

备注: 1. 根据所要检测的待测样品数量, 计算所需反应孔数, 一般做 3 个重复孔/样。

$$\text{反应孔数} = (\text{1 个阴性对照} + \text{1 个阳性对照} + \text{待测样品}) \times 3$$

2. 加样完成后, 盖上封板膜并封紧, 用离心机 1000 rpm 离心 1 min, 将液体离心至 qPCR 孔板底部, 如有气泡, 需将气泡排尽。

3. qPCR 反应程序如下 (建议打开仪器自带的探针法模板程序, 并在此模板上根据下表进行调整):

Step	1	2	
	热启动酶活化	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号)
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec

注意: 1. 95°C 反应 5 min 的目的是活化热启动酶, 此步骤为必须步骤, 因此不能省略; 2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集; 3. 不需要跑熔解曲线; 4. 设置程序时创建 Target 1 通道 (FAM), 选择报告荧光基因为 FAM, 淬灭荧光基因为 BHQ1 或 none, 此通道用于检测待测样本中的支原体及 Mycoplasma Positive Control; 创建 Target 2 通道 (VIC), 选择报告荧光基因为 VIC, 淬灭荧光基因为 BHQ1 或 none, 此通道用于检测 Mycoplasma Internal Control; 选择检测参比荧光为 ROX 或 None, 具体可根据仪器型号来决定。

七、qPCR 结果分析

1. 阴性对照 NC 的检测结果应为: FAM 信号 > 40 或无明显的起峰, VIC 信号 < 40 且有明显的扩增曲线。

2. 阳性对照 PC 的检测结果应为：FAM 信号 < 40 且有明显的扩增曲线，VIC 信号 < 40 且有明显的扩增曲线。
3. 待测样品 S 的检测结果判断方法如下：

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
< 40 且有明显的扩增曲线	< 40 且有明显的扩增曲线	阳性
	> 40 或无明显的起峰	有抑制，需要重复实验
> 40 或无明显的起峰	< 40 且有明显的扩增曲线	阴性
	> 40 或无明显的起峰	有抑制，需要重复实验

八、代表性实验结果

图 1. 支原体浓度与 Ct 值的线性关系。连续梯度稀释支原体标准品 Mycoplasma Positive Control，制备不同浓度的支原体。对每种浓度的支原体按照上述步骤进行检测，最终可得到标准曲线如右图。由图可以看出本试剂盒可对样本中支原体进行快速检测，其最低检测限可以达到 10 CFU/ml 级别。

