

EZ-Probe Mycoplasma Detection Kit (ROX1)

说明书

Cat. No.: EZ3605-R1

一、产品简介

EZ-Probe Mycoplasma Detection Kit (ROX1) 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-R11 (50 Rxns, 30 µl/Rxn)	EZ3605-R12 (100 Rxns, 30 µl/Rxn)	EZ3605-R13 (5,00 Rxns, 30 µl/Rxn)
2× Mycoplasma qPCR Reaction Mix (ROX1) *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、高浓度的 ROX1 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-R2）

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
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 (ROX1)、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 (ROX1)	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。

反应孔数 = （1 个阴性对照 + 1 个阳性对照 + 待测样品）× 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。

