

Mycoplasma Detection Kit for qPCR

支原体检测试剂盒（qPCR 法）

（Mycoplasma Detection Kit for qPCR）

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



YOCON 友康®

支原体检测试剂盒（qPCR法）

参照中国药典、欧洲EP 2.6.7、日本JP G3、美国USP 63、
《人源干细胞产品指导原则2023》等指南进行相关验证。

-20℃保存

MYCOPLASMA

本产品仅限科研用途

请妥善保管密封瓶

YOCON

使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCON 友康®

支原体检测试剂盒（qPCR法）说明书

【试剂盒简介】

支原体检测试剂盒（qPCR法）基于荧光定量PCR技术，采用多重PCR的方法检测支原体DNA，用于定性检测如培养基、细胞培养物以及生物制品中的支原体污染。本试剂盒可检测的支原体种类涵盖范围广，包括柔膜体纲（Mollicutes）下的多种支原体、无胆甾原体（Acholeplasma spp）、螺原体(Spiroplasma spp)等。经序列比对，可覆盖100多种支原体 DNA 序列，具备灵敏度高、特异性好等特点。已参照中国药典、EP 2.6.7、JP G3、USP 63、《人源干细胞产品指导原则2023》等指南进行了相关验证。

本产品使用两种荧光探针，FAM和HEX，分别检测支原体目标序列和内参对照。FAM通道特异性检测支原体，HEX通道检测内参对照。内参对照可在PCR反应阶段加入，用于排除因样品中含有PCR抑制因素导致的假阴性结果；也可在样品提取阶段加入，用于评估提取效果，排除提取不当而导致的假阴性。

本产品能够与本公司的核酸提取试剂盒搭配使用，提取样品中的支原体DNA，排除不同样本基质的干扰，提高检测的灵敏度。

【产品规格】

产品货号：MY0001-50

产品规格：50T/盒

【试剂盒组成】

表1. 试剂盒组分

试剂名称	货号	规格（50T）
5× 反应液	MYA-50	250 μL/ 管 ×1 管
酶	MYB-50	12.5 μL/ 管 ×1 管
阳性对照	MYC-50	200 μL/ 管 ×1 管
内参对照	MYD-50	200 μL/ 管 ×1 管
DEPC 处理水	MYE-50	1000 μL/ 管 ×2 管

【有效期】

-20 °C保存，12个月。

※5×反应液保存和使用过程注意避光。

※经验证，试剂反复冻融10次，不影响检测效果。

※内参对照在不提取样本检测时，需要100倍稀释后使用，现用现稀释，请勿反复冻融使用。

※请在有效期内使用试剂盒，不同批号的试剂组分不可以互换使用。

【实验前准备】

实验前请仔细阅读说明书，并按说明书进行操作。

表2. 实验所需耗材及设备

实验所需但试剂盒中未含耗材	检测相关设备
1.5 mL 或者 2.0 mL 无菌、低吸附离心管 PCR 八联管或 96 孔 qPCR 板 不同规格的无菌、低吸附带滤芯移液枪头	超净台或生物安全柜、离心机 微孔板离心机、漩涡振荡器 荧光定量 PCR 仪 不同规格的移液枪

【检测步骤】

1. 样本处理

① 样品经支原体DNA提取

很多样品（基质复杂的细胞培养物、血清、疫苗等）由于含有抑制PCR扩增的成分，建议样本处理后进行检测，如果样本不进行前处理，可能导致qPCR扩增失败。样本经支原体核酸DNA提取后，可消除样本基质中抑制成分的影响，提高检测的灵敏度。

推荐使用本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0103-50）进行样本提取，提取产物作为待测样本加入检测体系进行检测。

阴性对照的提取和待测样本同步操作，以评估是否存在样本交叉污染或环境污染情况。阴性对照可选择确定无污染的同类型检测样本或试剂盒中的DEPC处理水。

每份待提取的样本和阴性对照中需要加入2μL的内参对照，内参对照加入时间为样本裂解后，异丙醇加入之前。（详见提取试剂说明书）

② 样品不经支原体DNA提取

培养基样品、生物制品以及细胞培养上清等样本，可以直接取2 μL作为待测样本进行检测。

※直接检测样本时，若内参检出受到抑制（通过结果分析判断是否受到抑制），支原体无检出的结果不可信，建议提取后再次检测。

※细胞培养物样品需要取自换液后培养2-3天且汇合度在90%左右的细胞培养液上清（贴壁细胞），或者悬浮培养的细胞在换液传代后，让细胞生长 2-3 天再取培养液进行检测。

※含有大量细胞的样本，避免细胞对检测体系的干扰，可将样本离心后取上清进行检测（170 g离心10 min）。

2. 检测方法

使用前阅读说明书并按流程进行操作。

① 确定配制体系数量

配制体系数量N=（待测样品数+阴性对照+阳性对照+无模板对照）×重复孔数+1

② qPCR反应体系配制（配制区操作）

试剂准备：试剂盒中的各组分，提前在冰上完全融化、混匀后使用。

qPCR反应体系配制按下表进行：

表3. qPCR反应体系配制表

组分	单孔用量	用量
5× 反应液	5 μL	5 μL × N
酶	0.25 μL	0.25 μL × N
DEPC 处理水	14.75 μL	14.75 μL × N
总体积	20 μL	20 μL × N

按照表格配制反应液，充分混匀后，按照20 µL每管分装到PCR反应管中。

※反应液混匀过程可能会出现气泡，轻弹离心管可以消除气泡。

③加样（在样本处理区进行）

每个反应孔中加入5 µL模板，总反应体系为25 µL。

阴性对照、待测样本、无模板对照以及阳性对照的加样，具体参考下表进行：

表4. 各反应孔加样示例

阴性对照	20 µL qPCR 反应液 +5 µL 提取的阴性对照
待测样本（经核酸提取后）	20 µL qPCR 反应液 +5 µL 提取后的待测样本
无模板对照	20 µL qPCR 反应液 +5 µL DEPC 水
阳性对照	20 µL qPCR 反应液 +2 µL 阳性对照 +3 µL 内参对照（100 倍稀释）
待测样本（不需提取）	20 µL qPCR 反应液 +2 µL 待测样本 +3 µL 内参对照（100 倍稀释）

※完成加样后，盖紧管盖，在掌上离心机或者微孔板离心机上短时低速离心，将管盖和管壁的残留液体收集至管底，操作时尽量避免产生气泡。如有气泡，轻弹管底消除气泡。

※经核酸提取的样本，在提取过程加入了内参对照，配制体系过程就不需要再加入内参对照。

※样本不经提取检测时，内参对照用DEPC处理水100倍稀释后使用。

※为避免影响荧光信号读取，请注意不要在所用仪器的荧光采集位置做标记，或者使用刮板反复摩擦。

④ qPCR扩增（在扩增区操作）

将PCR反应管放入扩增仪器样品槽，按照对应顺序设置待测样本及各对照。读取FAM通道和HEX通道，反应体积设置为25 µL，反应程序：

表5. qPCR反应程序

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	5 min	1
变性	95 °C	5 sec	40
退火 / 延伸（荧光信号收集）	60 °C	15 sec	

※该扩增程序已经在上海宏石医疗科技有限公司SLAN-96P/-48P全自动医用PCR分析系统、西安天隆科技有限公司Gentier 96R全自动医用PCR分析系统上进行验证，分析参数可选择默认参数，如有需要可自行在合理范围内进行调整。如在其它设备上使用，遇到问题可与我公司技术人员联系。

※有些仪器的荧光信号采集时间大于15 sec，按照仪器最小时间设置荧光信号收集时间即可。

⑤结果分析

本试剂盒设置阴性对照、阳性对照、无模板对照作为质控，质控样品的结果应满足表6：

表6.质控样品结果判定

质控样品	FAM 通道	HEX 通道
阴性对照	NoCt	Ct 值≤ 35
阳性对照	Ct 值≤ 35	Ct 值≤ 35
无模板对照	NoCt	NoCt

※阴性对照、阳性对照和无模板对照结果符合表6的判定结果后，才能对待测样本进行结果判定；如结果与表6不符，待测样本的判定结果不可靠，需要分析原因。

按照下表进行待测样本的结果判定：

表7.待测样本的结果判定

FAM 通道	HEX 通道	结果判定
Ct 值≤ 35	Ct 值≤ 40 或者 NoCt	支原体阳性
NoCt	Ct 值≤ 35	支原体阴性
NoCt	NoCt	存在 PCR 抑制
边界值 $35 < Ct \leq 40$	Ct 值≤ 40 或者 NoCt	结果存疑，需复测

※边界值（FAM通道 $35 < Ct \leq 40$ ，且复孔检测时多为单孔检出）分析，出现此种情况可能样本中存在低浓度支原体污染或者检测的操作过程被支原体污染，推荐重复提取检测或者加大提取量重新提取并复孔检测，以确认样本是否支原体阳性。FAM通道复测结果出现 $Ct \leq 40$ （1孔或者复孔），判为支原体阳性，全部复孔NoCt则为支原体阴性。

※如果存在PCR抑制，需要重新提取测试或者对样品进行合适处理消除抑制因子（比如离心清洗、样本稀释等）后再进行检测。

※经验证，不同的样本基质可能会存在不同的干扰，直接检测的样本，需排除基质的干扰进行结果判读，否则可能存在假的判定结果。也可通过核酸提取，排除样本基质的干扰。

※反应管完成反应后，请勿打开反应管盖子。

【产品性能】

使用中国药典、EP2.6.7、USP<63>、JP G3等规定的支原体物种作为模板验证试剂盒性能，可以稳定检出10 CFU/mL的口腔支原体。

该qPCR试剂盒已验证可检测11种支原体物种（见下表），但不会检测到进化树上相关的其他物种，如梭菌、乳杆菌和链球菌，与其他常见细菌、真菌以及细胞DNA均无交叉反应。

表8.试剂盒性能

已验证可检测到的支原体种类		经检测，不会产生交叉反应的物种		
		欧洲药典列举的细菌	其他细菌	细胞
口腔支原体 猪鼻支原体 肺炎支原体 莱氏无胆甾原体 发酵支原体 精氨酸支原体	唾液支原体 人型支原体 解脲脲原体 微小脲原体 生殖支原体	丙酮丁醇梭菌 嗜酸乳杆菌 肺炎链球菌	金黄色葡萄球菌 铜绿假单胞菌 枯草芽孢杆菌 大肠杆菌 白色念珠菌 黑曲霉	293 细胞 DNA NK 细胞 DNA 干细胞 DNA

【参考文献】

- 1.中国药典2020版 四部：3301 支原体检查法
- 2.中国药典2020版 三部：9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则
- 3.《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
- 4.《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
- 5.欧洲药典 EP2.6.7: Mycoplasmas
- 6.美国药典 USP<63>: Mycoplasma Tests
- 7.日本药典 JP G3-14-170: Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products
8. FDA, Guidance for Industry :Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications
- 9.桂馨等. 细胞培养过程中支原体污染的检测及预防. 同济大学学报(医学版)：第34卷第3期2013年6月.
- 10.薛少华等.液体培养法与qPCR法对检测猪鼻支原体灵敏度比较. 广东畜牧兽医科：2023年（第48卷）第2期.

【注意事项】

- 1.本产品仅供科研使用。
- 2.实验过程，操作人员应佩戴手套与口罩进行操作，人可能携带口腔支原体或者唾液支原体，避免污染待测样本和检测体系。
- 3.使用本试剂前请仔细阅读说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样，严格按照说明书步骤操作。
- 4.实验室管理需尽量遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员需进行专业培训，实验过程严格分区进行，各区各阶段不可交叉使用，避免阳性对照、阳性样本、内参对照对检测体系的污染，所有消耗品仅作一次性使用。
- 5.体系配制和样本处理推荐使用生物安全柜，以防止交叉污染。
- 6.样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求。



文件版本号：2024 -V1.0.1

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网站：www.yocon.cn

