

ExCell Bio

ResiQuant[®] 支原体检测试剂盒（荧光探针 qPCR 法） 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRB00-1011S

CRB00-1011

CRB00-1012



| 产品概述

ResiQuant® 支原体检测试剂盒（荧光探针qPCR法）与ResiQuant® 支原体DNA提取纯化试剂盒配套使用，定性检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批以及细胞制品中是否有支原体的污染。

本试剂盒采用荧光探针qPCR技术，在支原体保守基因片段设计引物探针，依据序列比对结果可定性检测约200种支原体。检测特异性强，与支原体亲缘关系较近的细菌（乳酸杆菌、梭菌、链球菌等）和常见工程细胞如CHO、Vero、HEK293等无检出；根据EP 2.6.7、JP XVIII和USP <77>支原体检测相关要求验证，检测限可达10 CFU/mL，符合EP 2.6.7对于NAT方法替代培养法的检测灵敏性要求。

本试剂盒引入尿嘧啶-N-糖基化酶（uracil-N-glycosylase, UNG）防污染系统，可有效去除PCR产物的残留污染，降低由扩增产物污染而导致假阳性报告的风险。本试剂盒采用FAM+HEX/VIC双通道检测方法，且包含PC（阳性对照）和RC（回收控制），用于监测检测灵敏度及样本回收情况，降低假阴性报告的风险。试剂组分中含有参比染料ROX，适用于ABI荧光定量PCR仪或其他同类设备，起到荧光参比光程校正的作用。

首次使用建议先进行样本适用性研究，包括基质干扰、检测限及专属性。低水平污染样本（≤10 CFU/mL）中支原体核酸含量不符合正态分布，本试剂盒采用3复孔报告方式，置信度在95%以上。

| 产品应用

本试剂盒适用于生物制药过程中从中间产物到终产品的不同类型样本，与ResiQuant® 支原体DNA提取纯化试剂盒配套使用可定性检测支原体污染，检测限可达10 CFU/mL。

| 产品组分及储存条件

组分	CRB00-1011S (25T)	CRB00-1011 (50T)	CRB00-1012 (100T)
<i>Myco</i> Positive Control	280 μ L	280 μ L	280 μ L \times 2
<i>Myco</i> Negative Control	280 μ L	280 μ L	280 μ L \times 2
<i>Myco</i> Recovery Control	160 μ L	160 μ L	160 μ L \times 2
3 \times <i>Myco</i> qPCR Mix	250 μ L	500 μ L	500 μ L \times 2

储存条件：-40 ~ -18℃ 保存。

有效期：规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件：干冰运输。

适用仪器：适用但不限于 ABI 7500、伯乐 CFX-96、安捷伦 Mx3000P、Roche LightCycler 480。

| 实验准备

仪器及耗材

- 荧光定量PCR仪（须含有FAM，HEX/VIC通道，可选ROX通道）；
- 移液器和对应无菌低吸附带滤芯枪头；
- 无菌低吸附八连管（适配荧光定量PCR仪）；
- 洁净实验服，一次性手套、口罩等。

实验区域的划分

建议采用以下分区制度，避免造成交叉污染：

- 试剂配制区：用于3 \times *Myco* qPCR Mix的分装和*Myco* Negative Control的上样，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
- 样本准备区：用于样本核酸提取、纯化、洗脱和上样（*Myco* Negative Control除外）；
- PCR扩增区：与前两区域相对独立，进行PCR扩增的区域。

试剂配制区	样本准备区	PCR 扩增区
<ul style="list-style-type: none"> ❖ 3× <i>Myco</i> qPCR Mix 分装 ❖ <i>Myco</i> Negative Control 上样 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 样本核酸提取、纯化、洗脱 ❖ 纯化液上样 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ PCR 扩增

实验流程

英文简写	英文全称	名词解释
PC	Positive Control	阳性对照
NTC	No Template Control	无模板对照
NCS	Negative Control Sample	阴性对照样本
TS	Test Sample	待测样本

样本处理（样本准备区）

配套使用本公司的 ResiQuant® 支原体 DNA 提取纯化试剂盒。首次使用时，建议进行产品适用性研究，确认方法适用性（如基质干扰、检测灵敏性、专属性等）。

PCR 反应液准备（试剂配制区）

- 3× *Myco* qPCR Mix 室温解冻，涡旋混匀并瞬时离心，确保试剂收集于管底；
- 确定检测数量：检测数量 = (1个NTC + 1个PC) × 2 + (NCS数量+TS数量) × 3；
- 按照布板示例确认八连管反应孔位置，向反应孔中分别加入10 μL 3× *Myco* qPCR Mix备用（长时间建议暂存2~8℃）。

加样（样本准备区）

各反应孔加样示例：

样本名称	3× <i>Myco</i> qPCR Mix	模板
阳性对照（PC）	10 μL	20 μL <i>Myco</i> Positive Control
无模板对照（NTC）	10 μL	20 μL <i>Myco</i> Negative Control
阴性对照样本（NCS）	10 μL	20 μL 阴性对照样本纯化液
待测样本（TS）	10 μL	20 μL 待测样本纯化液

布板示例：

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A	NTC	NCS		TS1	TS3	TS5	TS...					PC
B	NTC	NCS		TS1	TS3	TS5	TS...					PC
C		NCS		TS1	TS3	TS5	TS...					
D												
E				TS2	TS4	TS6						
F				TS2	TS4	TS6						
G				TS2	TS4	TS6						
H												

注： ：阴性区； ：待测样本区； ：阳性区； ：缓冲区。

- 建议加样顺序：NTC、NCS、TS、PC；参照布板示例依次向各反应孔中分别加入20 μ L模板；
- 妥善盖好管盖或封好96孔板的封口膜，混匀离心后上机检测。

PCR 扩增（PCR 扩增区）

以下操作步骤以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为例：

1. 首先“log in”，进入主界面，点击屏幕左上角“New Experiment”新建实验；
2. 依次输入本次实验名称，选择机型“7500（96 wells）”、实验类型“Quantitation-Standard Curve”、试剂“TaqMan® Reagents”、实验时长“Standard”；
3. 选择“Plate Setup”栏下的“Define Targets and Samples”设定界面，选择报告基团为“FAM”，淬灭基团为“MGB”，新增报告基团为“VIC”，淬灭基团为“None”；输入样本名称；
4. 进入“Assign Targets and Samples”设定界面，选择样本Targets及在96孔板上的位置；
5. 在左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”；
6. 进入“Run Method”设定界面，将反应体系设为30 μ L，按下表设置反应程序；

程序A：

步骤	温度（℃）	时间（s）	循环数（次）
----	-------	-------	--------

1	消 化	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	65	40	
4	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	64	40	
5	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	63	40	
6	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	62	40	
7	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	61	40	
8	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	60	40	
9	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	59	40	
10	变 性	92	15	2
	退 火 & 延 伸	58	40	
11	变 性	92	15	35
	退 火 & 延 伸 (采集荧光)	57	40	
支原体检测通道：FAM；RC 检测通道：HEX/VIC				

程序B: (可用于程序设置步骤≤20的仪器)

步骤		温度 (°C)	时间 (s)	循环数 (次)
1	消 化	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变 性	92	15	5
	退 火 & 延 伸	63	40	
4	变 性	92	15	5
	退 火 & 延 伸	61	40	
5	变 性	92	15	6
	退 火 & 延 伸	59	40	
6	变 性	92	15	35
	退 火 & 延 伸 (采集荧光)	57	40	
支原体检测通道：FAM；RC 检测通道：HEX/VIC				

7. 全部设定好后, 选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测;

8. 检测完毕后选择最左侧的选择条“Analysis”，做数据分析；
9. 在“Amplification Plot”界面可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

阈值线设定

机型	FAM 通道	HEX/VIC 通道
ABI 7500 (含 ROX)	0.3 ΔR_n	0.3 ΔR_n
伯乐 CFX96 (不含 ROX)	150 RFU	200 RFU

备注：对于其他设备型号，请自行验证设定方法；

检验结果说明

样品	FAM	HEX/VIC	结果报告
NTC	2 复孔 $C_t \geq 30$ 或 No Ct	$C_t \geq C_{tPC} + 6$ 或 No Ct	有效：检测系统无污染
PC	2 复孔 $C_t \leq 25$ 且有效的“S”型扩增	$C_t \leq 24$ 且有效的“S”型扩增	有效：灵敏度合格
NCS	3 复孔 $C_t \geq 30$ 或 No Ct	有效的“S”型扩增， $C_t - C_{tPC}$ 建议 $\leq 1^*$	有效：提取无污染
TS	$C_t < 30$ 且有效的“S”型扩增	/	阳性（单孔阳性建议重复确认）
	$C_t < 30$ 且扩增曲线非典型“S”型扩增	/	阳性（建议重复）
	3 复孔 $C_t \geq 30$ 或 No Ct	有效的“S”型扩增， $C_t - C_{tPC}$ 建议 $\leq 1^*$	阴性
		$C_t > C_{tPC} + 1^*$	建议确认干扰

备注：*考虑实验室差异，可依据标准株验证结果调整合格 C_t 差值范围；

建议：验证时在待测基质中添加支原体菌株获得 10 CFU/mL 支原体加标样本作为阳性对照样本

（PCS）进行测试，3 复孔上样；FAM 通道 $C_t < 30$ 且有效的“S”型扩增时报告阳性。

操作注意细节

1. 不同批次 *Myco* Positive Control 和 *Myco* Recovery Control 不得混用；
2. 建议使用一次性手套、口罩，洁净的实验服；
3. 使用经校准的移液器；
4. 建议使用无菌低吸附带滤芯头；
5. 在不同的实验区域使用专用的移液器和枪头及相关设备；
6. 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
7. 阴性对照、待测样本、阳性对照使用专用移液器，不得混用，避免污染；
8. 建议加样顺序依次为无模板对照（NTC）、阴性对照样本（NCS）、待测样本（TS）、阳性对照（PC）；
9. 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
10. PCR产物不得开盖，避免气溶胶污染；
11. 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁；
12. 实验过程中的废弃枪头需及时浸泡在0.1%的次氯酸钠溶液中，实验结束后进行清场，喷洒0.1%的次氯酸钠溶液，消除气溶胶污染。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。