

# CANVEST® 支原体 qPCR 检测试剂盒

Cat #JCMY50

## 【试剂盒简介】

CANVEST® 支原体 qPCR 检测试剂盒采用荧光探针 qPCR 法,用于定性检测细胞库、病毒种子库、细胞及基因治疗产品、其他生物制品中间产品及终产品中是否有支原体污染。

试剂盒中的引物探针所检测的支原体种类覆盖度广(可以检测 >132 种支原体)、专属性强(不会与细菌、真菌、人类及动物细胞、常见病毒发生交叉反应)、灵敏度高(核酸检测限在 1~5genome copies/reaction,支原体灵敏度可达 10CFU/ml 以下)、耐用性强,严格按照 EP 2.6.7 和 JP XVII 支原体检测相关指南和要求进行了验证。

试剂盒中加入了内部控制系统,内部控制对照(IC)可在 PCR 扩增反应阶段加入,以判断待检样本对扩增反应是否存在抑制;也可在样本提取阶段加入,作为实验整体对照,同时监测提取率以及样本中可能存在的 PCR 抑制情况。

支原体提取纯化试剂盒推荐使用 QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit(QIAGEN, Cat#57704)。经过验证,此提取试剂盒搭配 CANVEST® 支原体 qPCR 检测试剂盒可高效稳定提取和检测各种生物样本中的支原体 DNA。

## 【试剂盒组分】

表 1 试剂盒组分

组份	装量(50 Tests)	储存条件
MyqPCR Reaction Buffer	625µl×1 管	-20°C及以下
MyPrimer&Probe Mix	125µl×1 管	-20°C及以下,避光
内部控制对照(IC)	275µl×1 管	-80°C
阳性对照(PC)*	25µl×1 管	-80°C
RNase-free Water	1ml×1 管	-20°C及以下

\* 阳性对照(PC)是浓度为 100copies/µl 的支原体基因组。

## 【规格】

50 Reactions

## 【运输储存方法】

1. 干冰运输。试剂盒开封前,-20°C及以下保存,有效期一年。
2. 初次使用时,建议将内部控制对照(IC)、阳性对照(PC)分装后储存于 -80°C,以减少反复冻融次数和避免污染。MyqPCR Reaction Buffer 和 MyPrimer&Probe Mix 储存于 -20°C。

## 【适用机型】

Bio-Rad: CFX 96、CFX Connect 等; Applied Biosystems: QuantStudio 1 Plus 等。

## 【实验流程】

### 一、样本预处理

#### 1、待测样本预处理

##### 1.1 小体积样本(≤200µl)

取 200µl 样本(总细胞数小于 10<sup>6</sup>)于 1.5ml 无菌离心管中,加入 5µl 内控对照质粒(可选),轻轻涡旋混匀,待提取。

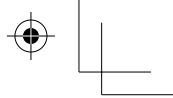
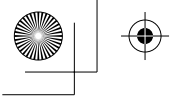
##### 1.2 大体积样本(>200µl)

(适用于未经灭活的、具有完整支原体细胞结构的天然样本)

##### 1.2.1 细胞样本(如普通培养细胞、干细胞制剂、CAR-T 细胞制剂、其他含细胞生物制品等):

- (1) 取 1ml 待测样本于 1.5ml EP 管中,500g 离心 5min,沉淀细胞;
- (2) 取去除细胞沉淀的上清液于另一 1.5ml EP 管中(尽量吸尽上清液,但不要吸到细胞沉淀),4°C 20000g 离心 10min,富集支原体;
- (3) 小心去除上清,但不要吸走支原体沉淀(可留下 20~30µl 上清),加入 500µl 0.9% 的无菌 NaCl,轻轻涡旋重悬支原体;
- (4) 4°C 20000g 离心 10min,再次富集支原体;

注:若样本上清基质成分简单(如细胞培养上清、干细胞和 CAR-T 细胞制剂上清等),则可省略步骤(3)和(4)。



(5)期间, 样本细胞计数, 取  $1 \times 10^6$  的细胞悬液于 1.5ml EP 管中, 500g 离心 5min, 去除细胞上清, 留下细胞沉淀;

注: 若只检测细胞上清, 则可省略步骤(5)。

(6)小心去除 (2) 或 (4) 中上清, 但不要吸走支原体沉淀 (可留下 20~30 $\mu$ l 上清), 用 170 $\mu$ l 0.9% 的无菌 NaCl 溶液重悬支原体沉淀;

(7)将 (6) 中的重悬液全部加入 (5) 中的细胞沉淀中, 轻轻涡旋混匀;

注: 若只检测细胞上清, 则可省略步骤(7)。

(8)加入 5 $\mu$ l 内部控制对照 (IC), 轻轻涡旋混匀, 待提取 (可选)。

### 1.2.2 无细胞样本 (如病毒上清、基因治疗产品等):

(1)取 1ml 待测样本于 1.5ml EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 20000g 离心 10min, 富集支原体;

(2)小心去除上清, 但不要吸走支原体沉淀 (可留下 20~30 $\mu$ l 上清), 用 170 $\mu$ l 0.9% 的无菌 NaCl 溶液重悬支原体沉淀;

(3)加入 5 $\mu$ l 内部控制对照 (IC), 轻轻涡旋混匀, 待提取 (可选)。

## 2、阴性提取对照 (NEC) 处理

取 195 $\mu$ l 0.9% 的无菌 NaCl 溶液, 加入 5 $\mu$ l 内部控制对照 (IC) (可选), 轻轻涡旋混匀, 待提取。

## 二、样本提取

采用 QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>®</sup> Virus Spin Kit (QIAGEN, Cat#57704) 进行提取。可参考以下实验步骤进行:

### 1、试剂盒准备

(1)将 310 $\mu$ l Buffer AVE 加入到 310 $\mu$ g Carrier RNA 中, 浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(2)将 1.4ml Buffer AVE 加入到 QIAGEN Protease 中, 小心混匀, 避免起泡, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(3)将 25ml 无水乙醇加入到 19ml Buffer AW1 中。

(4)将 30ml 无水乙醇加入到 13ml Buffer AW2 中。

(5)配制 0.9% NaCl 溶液 (3.6g NaCl 定溶到 40ml ddH<sub>2</sub>O 中, 再取 4ml 配制好的溶液加入 36ml ddH<sub>2</sub>O, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤, 分装)。

(6)观察 AL 是否有沉淀, 若有沉淀, 在 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中溶解。

### 2、样本提取

(1)根据所提样本数目配制 Buffer AL- Carrier RNA-AVE 混合液。一个样本: 0.22ml Buffer AL 中加入 6.16 $\mu$ l Carrier RNA-AVE, 上下颠倒 10 次 (为避免起泡, 不要涡旋);

(2)在 1.5ml EP 管中加入 25 $\mu$ l Protease AVE;

(3)在每管中加入 200 $\mu$ l 样本 (样本不足 200 $\mu$ l 用 0.9% 无菌 NaCl 溶液补足);

(4)在每管中加入 200 $\mu$ l Buffer AL (含 28 $\mu$ g/ml Carrier RNA), 涡旋 15s, 充分混匀 (不要将 QIAGEN Protease 直接加入到 Buffer AL 中);

(5)56 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 瞬时离心 1.5ml EP 管, 离下管盖和管壁上的液体;

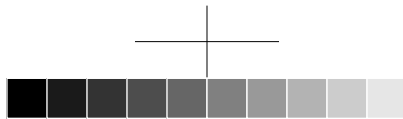
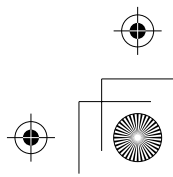
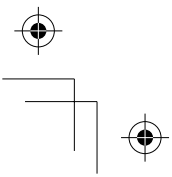
(6)加入 250 $\mu$ l 无水乙醇 (如果环境温度超过 25 $^{\circ}$ C, 乙醇在加入裂解液之前应在冰上冷却), 涡旋 15s, 室温反应 5min, 瞬时离心, 离下管盖壁上的液体;

(7)将上述液体全部收集到装载在 2ml 收集管中的 QIAamp Mini 离心柱中, 关闭管盖, 6000g (8000rpm) 离心 1min。弃掉装有滤液的 2ml 收集管, 将 QIAamp Mini 离心柱置入一个干净的 2ml 收集管中;

(8)加入 500 $\mu$ l Buffer AW1 于离心柱中, 关闭管盖, 6000g (8000rpm) 离心 1min。弃掉装有滤液的 2ml 收集管, 将 QIAamp Mini 离心柱置入一个干净的 2ml 收集管中;

(9)加入 500 $\mu$ l Buffer AW2 于离心柱中, 关闭管盖, 6000g (8000rpm) 离心 1min, 将 QIAamp Mini 离心柱置入一个干净的 2ml 收集管中;

(10)加入 500 $\mu$ l 无水乙醇于离心柱中, 关闭管盖, 6000g (8000rpm) 离心 1min;



(11) 将 QIAamp Mini 离心柱置入一个干净的 1.5ml EP 管中 20000g (14000rpm) 离心 3min, 去除残留;

(12) 将 QIAamp Mini 离心柱置入新 1.5ml EP 管, 打开离心柱盖常温放置 5min, 使无水乙醇挥发殆尽;

(13) 将 QIAamp Mini 离心柱置入一个新的 1.5ml EP 管, 第一次洗脱: 加入 100μl 无 RNA 酶水 (65°C 预热), 室温静置 5min, 20000g (14000rpm) 离心 2min;

(14) 第二次洗脱: 将洗脱下的 100μl 液体重新加入离心柱, 室温静置 5min, 20000g (14000rpm) 离心 2min。

### 三、样本检测

#### 1、qPCR 反应液的准备

(1) 根据所要检测样本的数量, 包括阳性对照 (PC), 无模板对照 (NTC), 阴性提取对照 (NEC) 和待测样本 (TS), 计算所需反应孔数, 一般每个样本做 2 个重复孔。

【注】: PC 和 NTC 为无需进行提取前处理的样本; NEC 和 TS 为需要进行提取前处理的样本。

反应孔数 = (1 个阳性质控 PC + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性提取对照 NEC + N 个待测样本 TS) × 2。

(2) 将 MyqPCR Reaction Buffer、MyPrimer&Probe Mix、阳性对照 (PC)、内部控制对照 (IC) 放置冰上融化。

#### 2、加样

2.1 若内部控制对照 (IC) 在 DNA 提取时已加入到样本中 (优选), 则按以下步骤进行加样:

(1) 根据反应孔数, 按表 2 配制 qPCR Mix (酌情考虑 1~2 孔损失量), 混匀后取 15μl qPCR Mix 加至各反应孔中。

表 2 qPCR Mix 配制表

组分	单孔用量
MyqPCR Reaction Buffer	12.5μl
MyPrimer&Probe Mix	2.5μl
总体积	15μl

(2) NTC、NEC、TS、PC 加样

a. 无模板对照 NTC 管: 取适量内部控制对照用无核酸酶水进行 20 倍稀释 (如取 1.5μl 内部控制对照加入 28.5μl 无核酸酶水), 取 10μl 稀释液加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

b. 阴性提取对照 NEC 管: 取阴性提取对照 NEC 10μl 加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

c. 样本管 TS: 取提取的待测样本 TS 10μl 加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

d. 阳性对照 PC 管: 取适量阳性对照基因组及内部控制对照用无核酸酶水进行 20 倍稀释 (如取 1.5μl 阳性对照基因组及 1.5μl 内部控制对照加入 27μl 无核酸酶水), 取 10μl 稀释液加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

2.2 若内部控制对照 (IC) 未在 DNA 提取时加入到样本中, 则按以下步骤进行加样:

(1) 根据计算的反应孔数, 按表 3 配制 qPCR Mix, 混匀后取 15μl qPCR Mix 加至各反应孔中。

表 3 qPCR Mix 配制表

组分	单孔用量
MyqPCR Reaction Buffer	12.5μl
MyPrimer&Probe Mix	2.5μl
内部控制对照 (IC)	0.5μl

(2) NTC、NEC、TS、PC 加样

a. 无模板对照 NTC 管: 取 10μl 无核酸酶水加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

b. 阴性提取对照 NEC 管: 取阴性提取对照 NEC 10μl 加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

c. 样本管 TS: 取提取的待测样本 TS 10μl 加入 15μl qPCR Mix 反应孔中, 总反应体积 25μl, 做 2 个重复孔。

d. 阳性对照 PC 管：取适量阳性对照基因组用无核酸酶水进行 20 倍稀释（如取 1.5μl 阳性对照基因组加入 28.5μl 无核酸酶水），取 10ul 稀释液加入 15μl qPCR Mix 反应孔中，总反应体积 25μl，做 2 个重复孔。

### 3. qPCR 程序设置

(1) 本方案中支原体探针偶联 FAM 荧光基团，内部控制探针偶联 HEX 荧光基团，在荧光定量 PCR 仪上创建 FAM 和 HEX 双通道。

(2) 反应程序如下：

表 4 qPCR 反应程序

1 cycle	95°C for 10min
45cycles	95°C for 15sec
	57°C for 25sec
	72°C for 20sec (Plate Read)

(3) 根据特定 qPCR 仪设备及配套控制软件选择 Ct 值读取模式，以 Bio-Rad CFX96 为例，Cq Determination Mode 选择 Regression 模式，或者选择 Single Threshold mode，手动拖拽阈值线至阳性对照线性扩增起始位置。

### 4. 结果判定

读取检测样本 TS、阴性提取对照 NEC、阳性对照 PC、无模板对照 NTC 的 Ct 值。NEC、PC、NTC 的检测结果应为表 5 所示，支原体样本结果判定遵循表 6 原则：

表 5 质控结果分析

质控样本	支原体 FAM 通道	内控 HEX 通道
阳性对照 PC	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)
提取阴性对照 NEC	阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)
无模板对照 NTC	阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)

表 6 支原体样本检测结果判定

支原体 FAM 通道	内控 HEX 通道	结果判定
阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)	无关	支原体阳性
阴性 (无 Ct 读值)	阴性 (无 Ct 读值)	PCR 抑制
阴性 (无 Ct 读值)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)	支原体阴性
边界值 (Ct≥40, 有正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)	结果无效, 加大提取量重复提取及 PCR 操作
边界值 (Ct≥40, 有正常扩增曲线)	阴性 (无 Ct 读值)	PCR 抑制

若内部控制对照在样本提取前加入作为包括提取及 PCR 整个过程的对照时，支原体阴性样本中 (FAM: 无 Ct 读值) 内部控制对照的 Ct 值与提取阴性对照 NEC 中 Ct 值间隔应在 +/- 3 cycles 范围之内。若内部控制对照在 PCR 反应时加入，支原体阴性样本中 (FAM: 无 Ct 读值) 内部控制对照的 Ct 值与提取阴性对照 NEC 中 Ct 值间隔应在 +/- 2 cycles 范围之内。

注：HEX 信号如果有抑制，需重测或对样本进行合适处理消除抑制因子。

### 【注意事项】

1. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本预处理、样本提取、样本检测。
2. 特别要注意样本之间交叉污染，阴性提取对照与支原体样本分区操作；加样时先加阴性对照，并及时封盖。
3. 加样和配液步骤尽量在冰上操作。
4. 每个组分在使用前应震荡混匀，瞬时离心。
5. 建议使用无菌低吸附带滤芯枪头 (DNase/RNase free)。



### 武汉珈创生物技术股份有限公司

地址：湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药企业加速器 3.1 期 4 栋 1 层、2 层、3 层

微信公众号

[www.canvestbio.com](http://www.canvestbio.com)

[bd@canvestbio.com](mailto:bd@canvestbio.com)

400-027 0021