

MycoHUABIO Mycoplasma qPCR Detection Kit

支原体 DNA 检测试剂盒(qPCR 法)K0105

【使用方法】

1. 配制预混液

将各试剂于冰上融解,Buffer 试剂上下颠倒轻轻混匀后轻微离心,其他试剂涡旋混匀后轻微离心。

按照下列组分配制反应预混液:

表 5.预混液配制表

试剂组分	单孔用量
Buffer	15 μ l
引物/探针混合物	4 μ l
内控	1 μ l
总体积	20 μ l

注:实验分为 1 个阳性组、1 个阴性组和 N 个实验组,每组应设 2 个重复,根据反应孔数计算所需的预混液总量。若实验组样品在 DNA 提取时(每个检测样品建议加入 20 μ l 内控)已加入内控,则配制反应预混液时应将内控替换为无菌水;DNA 提取时需设置阴性质控样品 NCS,即加入同等内控的无菌水,验证提取过程是否异常;提取的洗脱体积建议不超过 100 μ l,以保证 qPCR 反应的灵敏度。

2. 分装与加样

2.1 轻轻吹打混匀反应预混液,按 20 μ l 每孔分装到 qPCR 96 孔板中(阴性组排版时最好放在 A 行,并隔孔再加阳性组或实验组,降低污染的概率);

2.2 按照下表分组,将对应的模板加入到反应孔底部(样品间注意更换枪头,避免污染);

2.3 将 96 孔板用光学膜封板,轻微震荡混匀,快速离心后放入 qPCR 仪(避免徒手触摸光学膜)。

表 6.各反应孔加样示例

阴性组	10 μ l 无菌水+20 μ l 预混液
阳性组	10 μ l 阳性模板+20 μ l 预混液
实验组	10 μ l 待测样品+20 μ l 预混液

3. qPCR 程序设置

3.1 选择双通道水解探针法程序(FAM 为支原体检测通道,HEX 为内控检测通道)或根据不同仪器设置双通道检测, FAM 为支原体检测通道,HEX 为内控检测通道。

3.2 设置反应程序:

表 7.反应程序

阶段	预变性	变性	退火/延伸
温度	95 $^{\circ}$ C	95 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C
时间	2min	5s	35s
循环数	1	48	
检测	无	无	收集信号
反应体积	30 μ l		

■ qPCR 结果分析

不同仪器分析方法不同,分析后先查看下扩增曲线形态是否正常。分析后根据以下表格参考判断实验结果:

表 8.结果分析标准

	FAM 信号	HEX 信号	判定结果
阴性组	CT \geq 40 或无 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阴性
阳性组	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阳性
实验组	CT \geq 40 或无 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阴性
		CT \geq 40 或无 “S” 型扩增曲线	有抑制
	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	CT<40 且有 “S” 型扩增曲线	阳性
		CT \geq 40 或无 “S” 型扩增曲线	有抑制

注:如 HEX 信号有抑制,建议对样品进行基因组提取后再检测。