

## Venor®GeM qEP qPCR 支原体检测试剂盒

### 用途:

进口德国 Minerva 公司的 Venor®GeM qEP kit 用于定量检测细胞培养物及其他生物基质中的柔膜体纲微生物，如支原体、无胆甾原体、螺原体。

### 检测说明:

该试剂盒能一次检测欧洲药典（EP2.6.7）提到的所有支原体物种，并且能与大多数仪器配合使用。该试剂盒具有极好的特异性，针对的是支原体基因组中的高度保守区。

该试剂盒满足欧洲药典的检测标准，适合不同的样本类型（如软骨细胞、血清、细胞培养上清）。可直接检测细胞上清，或者先富集，或先抽提 DNA。该试剂盒完全符合欧洲药典的要求。

### 检测原理:

该试剂盒扩增柔膜体对应的 16S rRNA 上的特异序列，真核细胞和其他细菌 DNA 不会被检测到。

说明书包括筛查细胞培养上清和检查 DNA 的流程，包括对样本体积的要求。全部试验小于 3 小时，并且无需活细胞，因而和荧光染色、培养法等方法不同。PCR 具有更高的灵敏度和准确性。

内控 DNA 可用于鉴定 PCR 抑制或 DNA 抽提问题带来的假阴性。内控 DNA 可直接加到 PCR 预混液里，或加到 DNA 抽提之前的样本中。它可用于验证 DNA 抽提和 qPCR 扩增过程。它可从 Minerva 厂家购买（货号 11-9905）。内控对照的扩增结果在 560nm 检测（HEX 通道），而支原体的扩增在 520nm 检测（FAM 通道）。

试剂盒包括 dUTP，它替代 dTTP，方便用尿嘧啶 DNA 糖基酶（UNG）监视假阳性。该试剂盒不包含 UNG。

## 试剂:

试剂盒有 25 次、100 次、250 次反应三种规格。保质期见包装标签。在 2-8℃ 保存。水化后在 -18℃ 以下保存。

组分	25 次反应 货号 11-9025	100 次反应 货号 11-9100	250 次反应 11-9250	盖子颜色
预混液	1 管冻干	4 管冻干	10 管冻干	红色
缓冲液	1 管 1.8ml	1 管 1.8ml	3 管, 1.8ml/管	蓝色
阳性对照 DNA	1 管冻干	1 管冻干	2 管冻干	绿色
内控 DNA	1 管冻干	2 管冻干	4 管冻干	黄色
PCR 级别水	1 管 2ml	1 管 2ml	1 管 2ml	白色

批号质控可从厂家网站下载: [www.minerva-biolabs.com](http://www.minerva-biolabs.com)

## 细胞培养筛查:

细胞应长满 90% 以上。细胞上清可直接用于支原体检查, 无需再样品制备。但上清中可能累积抑制 PCR 的物质, 此时有必要进行 DNA 抽提。不清楚细胞培养基中的青链霉素是否抑制支原体或影响检测的灵敏度。

细胞培养中的支原体数量平均为  $1 \times 10^6$ /ml, 最多为  $1 \times 10^8$ /ml, 足以满足 PCR 的检测要求。PCR 的模板制备如下:

- 1、转移 500  $\mu$ l 细胞培养上清至 1.5ml EP 管, 盖紧盖。
- 2、样本孵育 95℃ 10 分钟。
- 3、样本最大转速离心 (15s) 以沉淀细胞碎片。
- 4、取 2  $\mu$ l 直接用于 qPCR, 或样品储存在 4℃, 最多 6 天。长期保存在 -20℃。

细胞团块不能直接用于检测, 因为细胞碎片会干扰 PCR 反应。细胞团块和胎牛血清、疫苗、冻存的细胞、石蜡包埋的组织切片, 都需要先进行 DNA 抽提。

Venor<sup>®</sup>GeM Sample Preparation kits (货号 56-1010/-1050/-1200) 适合手动 DNA 抽提  
Venor<sup>®</sup>GeM Sample Preparation Kit - IPC16 (货号 56-2096) 适合自动化 DNA 抽提

已抽提的 DNA 在 4℃ 保存最多 6 天。长期保存必须在 -18℃ 以下。

## 符合欧洲药典（EP 2.6.7）的样品检查

### 1、使样品浓缩

样本体积在 200~1000 $\mu$ l 则需要浓缩。需保证细胞完整，避免浓缩前细胞被破坏（如热灭活）。样本体积 $\leq$ 200 $\mu$ l 则无需浓缩。

- 1) 转移 $\leq$ 1ml 样品上清至 1.5ml 离心管。
- 2) 离心 $\geq$ 10000  $\times$  g 15 分钟（或 $\geq$ 13000 $\times$  g 6 分钟），以沉淀支原体颗粒。
- 3) 弃掉上清，用 200 $\mu$ l Tris 缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.4）重悬沉淀。
- 4) 样本涡旋混匀，然后直接进行样本稳定化处理或 DNA 抽提。

### 2、使样品稳定

细胞培养样品易含丰富的 DNA 酶，在低温下也能降解支原体 DNA。因而推荐进行样品稳定化处理。如果立即进行 DNA 抽提，则忽略这一步。

- 1) 转移 500 $\mu$ l 细胞培养上清至 1.5ml 离心管。盖上管盖。
- 2) 95 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。
- 3) 最大速度进行样本离心（15 秒），以沉淀细胞碎片。
- 4) 样本即可用于 DNA 抽提，或储存在 4 $^{\circ}$ C，最多 6 天。长期保存在-18 $^{\circ}$ C 以下。

### 3、DNA 抽提

大量证据表明，DNA 抽提可实现最高的灵敏度。DNA 抽提有多种方法，但应适合支原体基因组。我们推荐：

Venor $^{\circ}$ GeM Sample Preparation kits （货号 56-1010/-1050/-1200）适合手动 DNA 抽提  
Venor $^{\circ}$ GeM Sample Preparation Kit - IP C16 （货号 56-2096）适合自动 DNA 抽提

这些 DNA 抽提试剂盒已经过大量验证，具体流程参见试剂盒说明书。

## 推荐


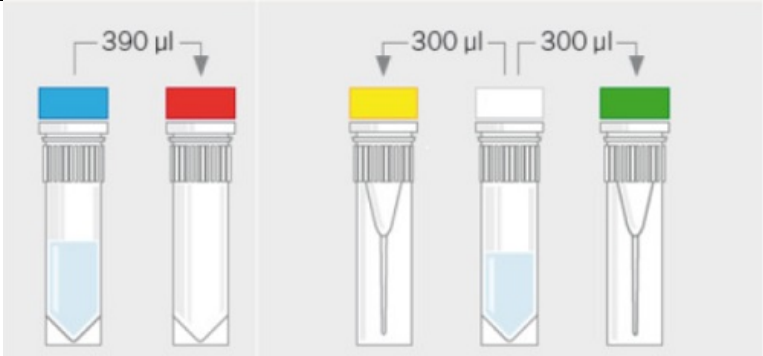

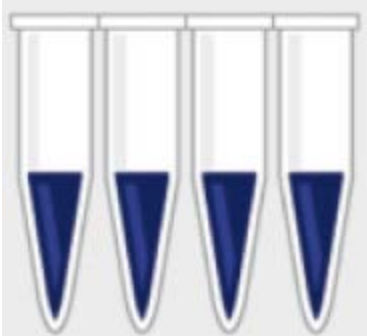
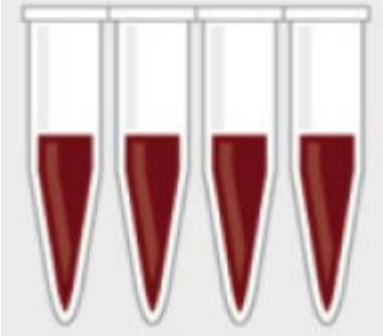
- Venor $^{\circ}$ GeM qEP kit 包含的内控 DNA 对照，也用于验证 DNA 抽提步骤。

- 请注意，内控DNA体积与洗脱体积有关，与实际样本体积无关。要获得10 $\mu$ l的DNA产出，则在样本中加入2 $\mu$ l的内控DNA，混匀后进行DNA抽提（例如：如果洗脱体积为60 $\mu$ l，则需将12 $\mu$ l内控DNA加到最初的样品中）。如果内控DNA已在这时加过，则不要再将内控DNA加入到qPCR的预混液中。
- 注意，样本浓缩时不要加内控DNA。
- 内控DNA可单独购买（货号11-9905）。

## 重要事项

- 使用前充分阅读说明书。不要和其他批次的试剂混合使用。在保质期之前使用。
- 完全遵循流程操作。任何偏离都可能影响到结果。
- PCR抑制可能因样本基质或者洗脱液产生。因而我们推荐Venor®GeM Sample Preparation kit用于DNA制备，其他品牌试剂盒需要经过试验以保证合格。
- 一定纳入对照品，以保证结果的可靠。阳性对照和阴性对照有助于排除试验的意外。
- 对照品应和待测品并排处理和检测。你也许希望纳入其他对照品，如高中低不同含量的DNA样品。请注意，Minerva公司也提供外部质控项目的参与。

## 操作流程一览

<b>1、试剂和对照离心</b> 			
<b>2、加水溶解</b>			<b>3、室温孵育 5 分钟</b>
			
a) 预混液	b) 内控对照		c) 阳性对照
<b>4、反应体系的制备</b>			
符合欧洲药典的检测		细胞培养上清的筛查	
	1 个反应		1 个反应
预混液 (红盖)	15 µl	预混液 (红盖)	15 µl
内控对照 (黄盖)	1 µl	PCR 级别水 (白盖)	8 µl
		内控对照 (黄盖)	1 µl
<b>5、反应体系小心吹打混匀</b>			
加到 PCR 管中		加到 PCR 管中	
			
15 µl 反应体系		23 µl 反应体系	
+10 µl 提取 DNA, 或+10 µl 阳性对照, 或+10 µl 洗脱缓冲液(阴性对照)		+2 µl 细胞培养上清, 或+2 µl 阳性对照, 或+2 µl PCR 级别水 (阴性对照)	
<b>6、开始 PCR 扩增</b>			

## 盖子颜色标识

	预混液（冻干）		内控对照		阳性对照
	预混液溶解用缓冲液		PCR 级别水		

## 详细步骤

### 1. 试剂制备

检测应包括阴性对照、阳性对照、样品，并设置复管。所有试剂和样品在使用前在 2~8℃ 达到平衡。干粉溶解后，试剂应在 <-18℃ 保存。避免反复冻融。溶解后的内控对照和阳性对照应分装保存。

1. 预混液	红盖	
内控 DNA	黄盖	最大速度离心所有冻干组分，5 秒钟
阳性 DNA	绿盖	
2. 预混液	红盖	加 390 μl 溶解用缓冲液（蓝盖）（供 25 个反应）
3. 内控 DNA	黄盖	加 300 μl PCR 级别水（白盖）
4. 阳性 DNA	绿盖	加 300 μl PCR 级别水（白盖）
5. 预混液	红盖	
内控 DNA	黄盖	室温孵育 5 分钟
阳性 DNA	绿盖	
6. 预混液	红盖	
内控 DNA	黄盖	DNA 短时涡旋振荡，最高速离心 5 秒钟
阳性 DNA	绿盖	

### 2. 反应体系制备

第 2 步至第 4 步应在 45 分钟内完成，避免荧光信号衰减。遵循下表建立反应体系。

1. 根据样本数来准备预混液的体积。在室温将下列组分在 1.5ml 反应管中混合			
<b>符合欧洲药典的检测</b>			
	盖子颜色	1 个反应	25 个反应
预混液	红	15 μl	375 μl
内控 DNA	黄	1 μl	25 μl
<b>细胞培养物筛查</b>			
	盖子颜色	1 个反应	25 个反应
预混液	红	15 μl	375 μl
PCR 级别水	白	8 μl	200 μl
内控 DNA	黄	1 μl	25 μl
2. 预混液用移液器吹打混匀（5 次）			
3. 每个 PCR 管加入 15 μl（对于符合欧洲药典的检测）或 23 μl（对于细胞培养物的筛查）预混液，弃掉剩余液体。			

### 3. 添加样品

建立阳性对照和阴性对照（不含模板），均设复管
1、制备不含模板的对照
对于符合欧洲药典的检查：加 10 $\mu$ l DNA 提取试剂盒提供的洗脱液
对于细胞培养物的筛查：加 2 $\mu$ l 水或新鲜细胞培养基或洗脱缓冲液
2、加入待测样本
对于符合欧洲药典的检查：加 10 $\mu$ l 抽提的 DNA
对于细胞培养物的筛查：加 2 $\mu$ l 样本
3、制备阳性对照
对于符合欧洲药典的检查：加 10 $\mu$ l 溶解的阳性对照 DNA
对于细胞培养物的筛查：加 2 $\mu$ l 溶解的阳性对照 DNA
4、短时离心，保证所有管都盖好。

### 4. 开始 qPCR 扩增

程序设定见附录 1

下列仪器已经通过 PCR 反应验证

qPCR 仪	生产商
CFX-96	Bio-Rad
LightCycler®2.0	Roche Diagnostics
ABI Prism® 7500	Applied Biosystems
RotorGene® 6000	Corbett Research
Mx3005P®	Agilent Technologies
AriaMx	Agilent Technologies

## 数据分析

FAM 通道检测支原体荧光信号。依据 DNA 标准曲线和 Ct 值定量。具体步骤需参考具体 qPCR 仪及软件的功能。我们推荐对包括对照在内的每个样品的扩增曲线进行评估。

Ct < 40 为阳性结果。Ct ≥ 40 为阴性结果。支原体 DNA 和内控 DNA 存在信号的竞争性抑制。支原体 DNA 越多，FAM 通道信号越高，检测内控对照的 HEX 通道信号越低。

检测支原体 FAM™ 通道	内控对照 HEX™ 通道	结果说明
+	无关	支原体阳性
-	-	PCR 存在抑制
-	+	支原体阴性

## 检测参数

### 1、灵敏度

检测阈限采用欧洲药典（EP2.6.7）规定的支原体物种作为模板测定。这些支原体来自培养基肉汤，并经传统培养法进行了滴定。

物种	检测阈限 LOD <sub>95</sub> [CFU/ml]	物种	检测阈限 LOD <sub>95</sub> [CFU/ml]
莱氏无胆甾原体	≤ 10CFU/ml	肺炎支原体	≤ 10CFU/ml
猪鼻支原体	≤ 10CFU/ml	精氨酸支原体	≤ 10CFU/ml
发酵支原体	≤ 10CFU/ml	鸡败血支原体	≤ 10CFU/ml
口腔支原体	≤ 10CFU/ml	螺原体	≤ 10CFU/ml
关节液支原体	≤ 10CFU/ml		

### 2、特异性

该 qPCR 试剂盒也可检测更多的柔膜体物种（见下表），但不会检测进化树上相关的其他物种，如梭菌、乳杆菌和链球菌。水生的伯克氏菌属也不会被检测到。和其他细菌和哺乳动物 DNA 均无交叉反应。

能检测到的其他柔膜体	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	哺乳动物
关节炎支原体	丙酮丁醇梭菌	沙眼衣原体	Vero-B4 细胞
生殖支原体	嗜酸乳杆菌	肺炎军团菌	Per. C6 细胞
人型支原体	肺炎链球菌	藤黄微球菌	RK13 细胞
渗透支原体		白色念珠菌	CHO-K1 细胞
唾液支原体		粪肠球菌	小鼠基因组 DNA
解脲支原体		产气肠杆菌	小牛胸腺 DNA
		大肠杆菌	胎牛血清
		奇异变形杆菌	马血清
		洋葱伯克霍尔德菌	山羊血清



## 附录 1.

### LightCycler® 2.0 程序设置

#### 程序 1: 预孵育

循环数	1
分析模式	无
目标温度	阶段 1
目标温度 (°C)	95
孵育时间 (分)	2 分钟
变温速率 (°C/s)	20
第二目标温度 (°C)	0
步长 (°C)	0.0
步骤显示 (循环数)	0
获得模式	无

#### 程序 2: 扩增

循环数	45
分析模式	定量
目标温度	阶段 1    阶段 2    阶段 3
目标温度 (°C)	95            55            60
孵育时间 (秒)	15            30            45
变温速率 (°C/s)	20.0        20.0        20.0
第二目标温度 (°C)	0            0            0
步长 (°C)	0.0            0.0            0.0
步骤显示 (循环数)	0            0            0
获得模式	无            单一        无

#### 程序 3: 冷却

循环数	1
分析模式	无
目标温度	阶段 1
目标温度 (°C)	40
孵育时间 (秒)	30
变温速率 (°C/s)	20.0
第二目标温度 (°C)	0
步长 (°C)	0.0
步骤显示 (循环数)	0
获得模式	无

### 结果读数:

- 选择荧光通道1和2
- 点击“定量”，产生扩增曲线和Ct值
- 自动产生阈值
- 扩增曲线无显著上升则为阴性

**ABI Prism® 7500 程序设置** (参见试剂盒说明书英文版附录 1)

**ABI StepOne / StepOne Plus 程序设置** (参见试剂盒说明书英文版附录 1)

**RotorGene® 6000 (5-plex) 程序设置** (参见试剂盒说明书英文版附录 1)

**Mx3005P®程序设置** (参见试剂盒说明书英文版附录 1)

### LC 480 程序设置

这个流程是依据经验和客户的报告。Minerva 公司不负有该流程运行效果的责任。

#### 程序 1: 预孵育

循环数	1
分析模式	无
目标温度	阶段 1
目标温度 (°C)	95
孵育时间 (分)	3.00
变温速率 (°C/s)	4.4
第二目标温度 (°C)	0
步长 (°C)	0.0
步骤显示 (循环数)	0
获得模式	无

#### 程序 2: 扩增

循环数	45		
分析模式	定量		
目标温度	阶段 1	阶段 2	阶段 3
目标温度 (°C)	95	55	60
孵育时间 (秒)	30	30	45
变温速率 (°C/s)	4.4	2.2	4.4
第二目标温度 (°C)	0	0	0
步长 (°C)	0.0	0.0	0.0
步骤显示 (循环数)	0	0	0
获得模式	无	单一	无

#### 程序 3: 冷却



循环数	1
分析模式	无
目标温度	阶段 1
目标温度 (°C)	40
孵育时间 (秒)	30
变温速率 (°C/s)	2.2
第二目标温度 (°C)	0
步长 (°C)	0.0
步骤显示 (循环数)	0
获得模式	无

启动 LC480 前，确保滤光器设置正确

LightCycler 480	柔膜体	内控对照
仪器 I	533nm	568nm
仪器 II	510nm	580nm

## Biorad CFX 96 程序设置

运行 “Setup Protocol”

点击 “Creat New”，打开流程编辑窗口。

选择图片或文字显示中的任何一个步骤，该步骤即高亮变蓝

选择 “温度” 或 “时间” 进行编辑

运行 “Setup Plate”

点击 “Creat New”，打开 PCR 板编辑窗口。

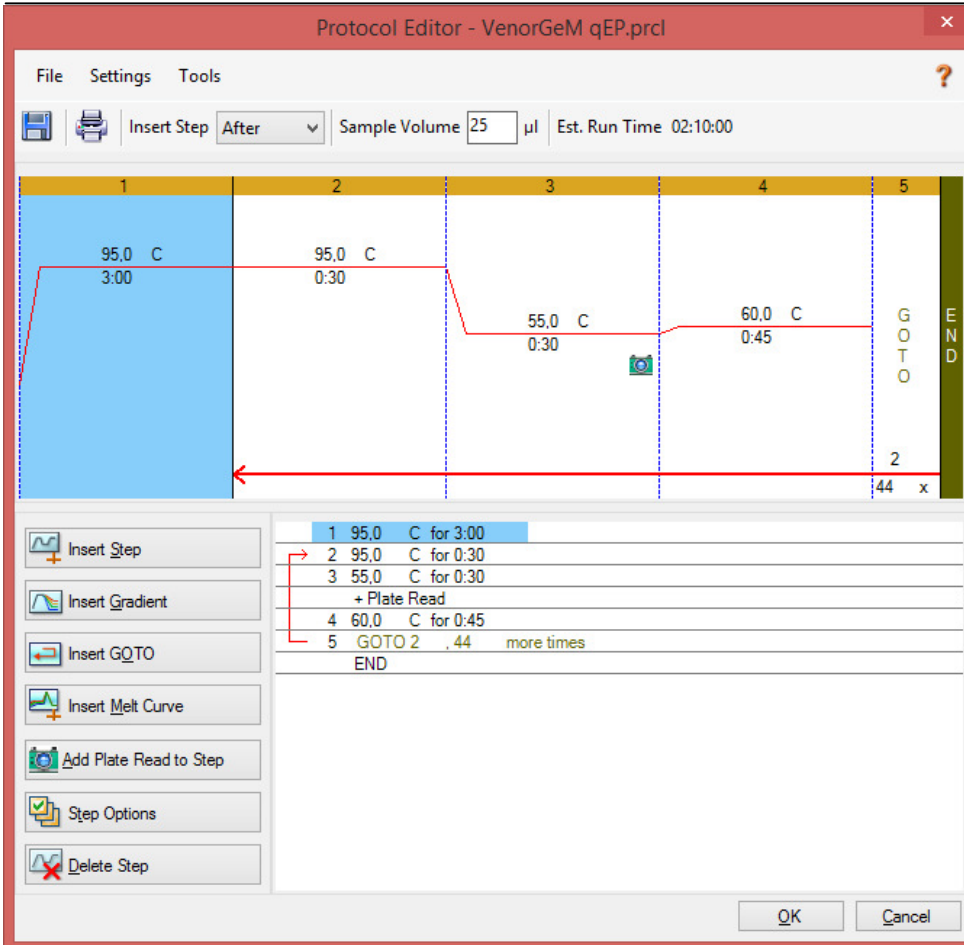
使用 “Plate Editor” 工具栏中的 “Scan Mode” 菜单，设定运行时数据获取模式。

注意！选择 “All Channels” 模式。

点击 “Select Fluorophores”，选择 FAM 检测支原体扩增，HEX 检测内控对照。在 Plate 界面，选择 PCR 板上的待测孔。

在 “Quantification” 标签会显示从每个孔收集的每个循环的荧光信号轨迹。在扩增曲线图下选择 fluorophore checkboxes，分别选择 FAM 检测支原体扩增，HEX 检测内控对照。

软件有两种定量方式。选择菜单栏中的 Setting(设置)，选择 “Baseline Subtracted Curve Fit” 作为基线设置，选择 Single Threshold mode 作为 Cq 确定模式。在 Single Threshold 模式中，手动定位 Cq 阈值线，应在阳性扩增反应的最初线性区设定。



## 附录 2.

### 产品的有限担保

本保证限定了我们对本产品更换的责任。即不提供任何明确的或默示的保证，包括无任何限制的、对适销性或适合某一特定用途的隐含保证。对于使用中产生的任何直接、间接、随之带来的或偶然出现的损坏，对于使用后的结果或本产品的无法使用，**Minerva Biolabs** 不应承担任何责任。