

ExCell Bio

ResiQuant[®] 支原体 DNA 提取纯化试剂 盒（磁珠法）说明书

本品仅用于科学研究及生产，不适用于临床诊断和治疗。

User Manual

Catalog Number CRB00-0031S
 CRB00-0031
 CRB00-0032



I 产品概述

支原体具有潜在的感染风险，可以感染人类、动物和植物，包括生物制品和药品生产过程中使用的细胞培养物。支原体污染可导致宿主细胞DNA、RNA及蛋白表达发生改变，如DNA和RNA合成的中断、膜抗原的改变，从而影响细胞生长和增殖。中国药典支原体检查法中培养法耗时久、指示细胞法灵敏度低，不满足生物药快速检测及放行的实际需求。现有EP、USP及JP等多国药典均推荐使用NAT方法替代传统检测方法。

ResiQuant®支原体DNA提取纯化试剂盒（磁珠法）与ResiQuant®支原体检测试剂盒（荧光探针qPCR法）（CAT. CRB00-1011/CRB00-1012）配套使用进行支原体检测快速放行。依据EP 2.6.7验证要求，该试剂盒进行了特异性、检测限和耐用性等方面的验证，可检测包括EP 2.6.7要求检测菌株在内的多种支原体。与药典培养法可比性研究结果表明，ResiQuant®支原体检测试剂盒（荧光探针qPCR法）（CAT. CRB00-1011/CRB00-1012）的LOD可达到10 CFU/mL，可替代药典培养法。ResiQuant®支原体DNA提取纯化试剂盒（磁珠法）经过多种样本基质验证，可提取纯化微量支原体核酸。

首次使用本试剂盒建议进行适用性研究，排除可能的基质干扰。测试结果仅反映样本当前状态，取样方法对检测结果有重要影响，建议对抽样策略进行风险评估。根据中国药典（2020版）支原体检查培养法，建议最小取样量0.5~1 mL。本试剂盒给出不同样本量的处理方案，建议在正式使用前进行验证。

I 产品应用

该试剂盒可用于生物样品进行支原体核酸的微量提取，既适用于细胞培养上清、牛血清、无血清培养基及细胞冻存液等样本，也适用于细胞库、治疗用细胞等样本，可直接处理 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 的细胞样本。

I 产品组分及储存条件

| 序号 | 组分 | CRB00-0031 (15T) | CRB00-0032 (30T) | CRB00-0031S (15T) |
|-------|----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Box 1 | Myco Lysis Buffer 1 | 300 µL | 300 µL×2 | 300 µL |
| | Proteinase K Buffer | 450 µL | 450 µL×2 | 450 µL |
| | 5M NaCl | 750 µL | 750 µL×2 | 750 µL |
| | Myco Lysis Buffer 2 | 3 mL | 6 mL | 3 mL |
| | Myco Magnetic Beads | 225 µL | 225 µL×2 | 225 µL |
| | Myco Wash Buffer | 8 mL | 15 mL | 8 mL |
| | Myco Elution Buffer | 1.5 mL | 1.5 mL×2 | 1.5 mL |
| Box 2 | Proteinase K | 450 µL | 450 µL×2 | 450 µL |

储存条件：Box 1 组分室温保存；Box 2 组分-40~-18℃保存。

有效期：规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件：Box 1 常温运输，Box 2 干冰运输。

| 实验准备

仪器及自备试剂

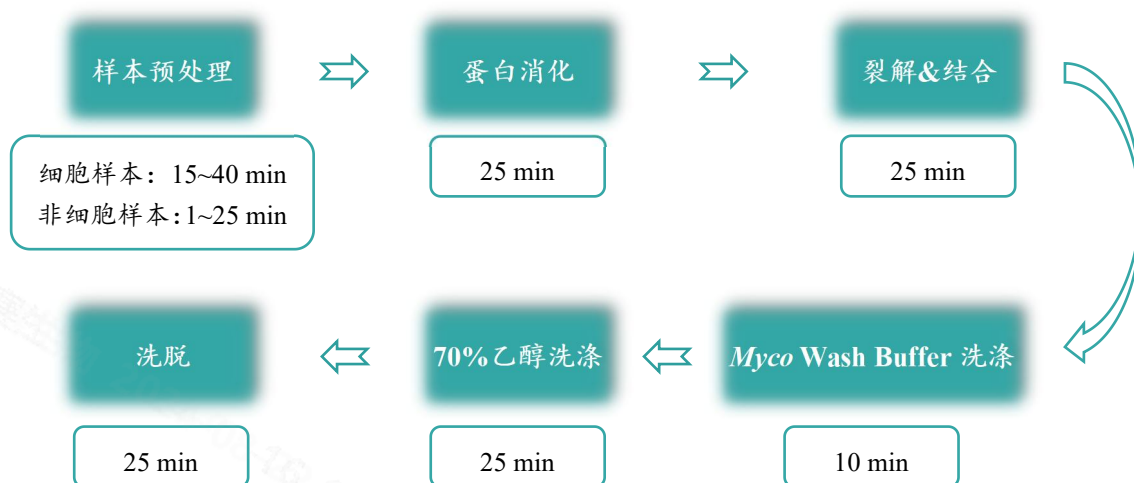
- 高速离心机;
- 漩涡振荡器;
- 磁力架;
- 迷你离心机;
- 金属浴;
- 1.5 mL 无菌低吸附离心管;
- 无菌低吸附带滤芯枪头;
- 无水乙醇 (AR);
- 异丙醇 (AR);
- 无菌PBS溶液 (0.15M, pH 7.2);
- 灭菌超纯水 (PCR级)。

试剂盒首次使用

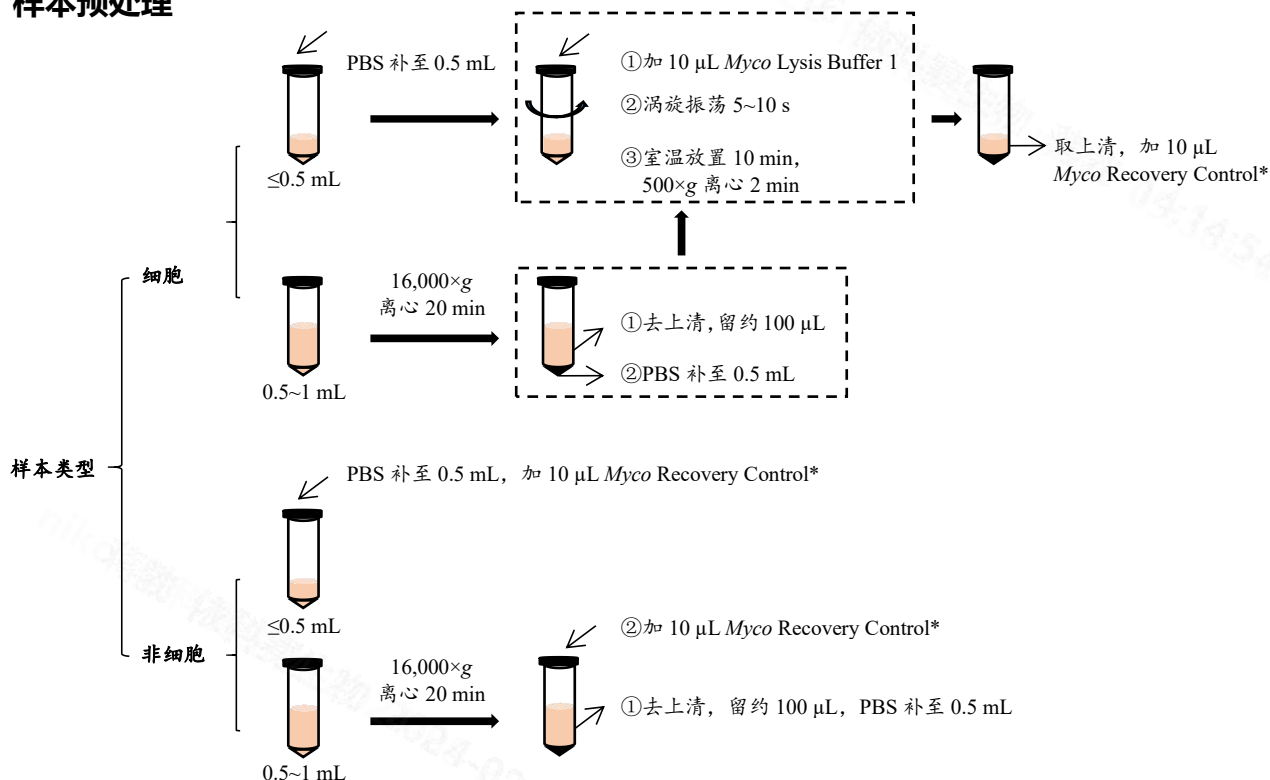
- Proteinase K Buffer、5M NaCl、Myco Lysis Buffer 2和Myco Wash Buffer若出现沉淀或结晶，可37℃孵育5~10 min以溶解沉淀或结晶;
- 使用前，请根据标签提示向Myco Wash Buffer中加入相应体积的无水乙醇;
- 70%乙醇现用现配。使用灭菌超纯水配制，配制后应密封，防止乙醇挥发。

| 实验流程

操作流程



样本预处理



注意:

- (1) * *Myco* Recovery Control 为 ResiQuant® 支原体检测试剂盒（荧光探针 qPCR 法）（CAT. CRB00-1011/CRB00-1012）的组分，作为回收控制用于监测支原体 DNA 提取纯化过程，使用前需涡旋振荡 5~10 s 充分混匀；
- (2) 建议取样量 ≤1 mL，大体积样本可参照 0.5~1 mL 的样本进行离心预处理，需要自行验证。

● 细胞样本

A. 取样量 ≤0.5 mL:

- (1) 不足 0.5 mL 用 PBS 补至 0.5 mL；
- (2) 向离心管中加入 10 μL *Myco* Lysis Buffer 1；
- (3) 涡旋振荡 5~10 s 充分混匀后室温静置 10 min；
- (4) 500×g 离心 2 min；
- (5) 用移液器沿液面小心吸取上清转移到新离心管，注意枪头不要碰到沉淀；
- (6) 向上清中加入 10 μL *Myco* Recovery Control；

B. 取样量 0.5~1 mL:

- (1) 16,000×g 离心 20 min；
- (2) 用移液器沿液面小心吸去上清，注意枪头不要碰到沉淀，留约 100 μL 液体，以防靶标损失；
- (3) 剩余液体用 PBS 补至 0.5 mL；
- (4) 向离心管中加入 10 μL *Myco* Lysis Buffer 1；

- (5) 涡旋振荡5~10 s充分混匀后;
- (6) 室温静置10 min;
- (7) 500×g离心2 min;
- (8) 用移液器沿液面小心吸取上清转移到新离心管, 注意枪头不要碰到沉淀;
- (9) 向上清中加入10 μ L *Myco Recovery Control*。

- **非细胞样本**

- A. 取样量 ≤ 0.5 mL:**

- (1) 不足0.5 mL用PBS补至0.5 mL;
- (2) 向离心管中加入10 μ L *Myco Recovery Control*;

- B. 取样量0.5~1 mL:**

- (1) 16,000×g离心20 min;
- (2) 用移液器沿液面小心吸去上清, 注意枪头不要碰到沉淀, 留约100 μ L液体, 以防靶标损失;
- (3) 剩余液体用PBS补至0.5 mL;
- (4) 向剩余液体中加入10 μ L *Myco Recovery Control*。

- **对照组**

阴性对照样本 (NCS): 参考以上样本预处理步骤制备含RC的阴性对照样本, 可提示提取过程是否存在污染;

建议:

- (1) 对试剂盒进行方法学验证时设置阳性对照样本 (PCS), 参考以上样本预处理步骤制备含 RC 的阳性对照样本 (建议使用支原体标准株, 检测试剂盒中 *Myco Positive Control* 不可用于 PCS 的制备), 可监测支原体 DNA 提取纯化及检测全过程, 降低假阴性报告的风险。根据模拟的样本类型及样本体积选择合适的预处理方案进行操作。
- (2) 阳性对照样本与阴性对照样本和待检样本分开处理, 可选择分时间操作、分区操作。

蛋白消化

方案 A:

- (1) 每管分别加入 30 μ L Proteinase K Buffer、50 μ L 5M NaCl 和 20 μ L Proteinase K;
- (2) 涡旋振荡 5~10 s 充分混匀;

注意: 不要预混, 试剂加入后出现絮状物为正常现象, 涡旋振荡及加热后絮状物会消失。

- (3) 70°C 孵育 15 min;
- (4) 室温冷却 5 min;
- (5) 瞬时离心 1~2 s 将管盖上液体离下。

方案 B: 复杂基质, 如含 5% HSA 样本基质等

- (1) 每管分别加 30 μ L Proteinase K 和 200 μ L *Myco Lysis Buffer 2*;

- (2) 涡旋振荡 5~10 s 充分混匀；
- (3) 70°C 孵育 15 min；
- (4) 冷却至室温；
- (5) 瞬时离心 1~2 s 将管盖上液体离下。

注意：后续提取可分为手动提取和核酸提取纯化仪提取，完成样本蛋白消化后需及时进行下述核酸提取！

手动提取操作步骤

裂解&结合

- (1) 采用蛋白消化方案 A 的样本每管分别加入 200 μ L Myco Lysis Buffer 2 和 300 μ L 异丙醇；采用蛋白消化方案 B 的样本每管加 300 μ L 异丙醇；
- (2) 涡旋振荡 5~10 s 充分混匀；
- (3) 瞬时离心后每管加入 15 μ L Myco Magnetic Beads，室温涡旋振荡离心管 10 min；

注意：Myco Magnetic Beads 使用前需涡旋振荡 30 s 充分混匀。若样本数量较多，中间需再次涡旋振荡 5~10 s 再使用。

- (4) 瞬时离心后将离心管置于磁力架上，室温静置 2~5 min 至磁珠成团贴壁、液体变清澈；
- (5) 保持离心管于磁力架上，避免震动，用移液器沿液面小心吸去液体，尽量吸尽残余液体，注意枪头不要碰到磁珠。

Myco Wash Buffer 洗涤

- (1) 每管加入 700 μ L Myco Wash Buffer（使用前检查是否加入无水乙醇）；
- (2) 涡旋振荡 30 s 重悬磁珠；
- (3) 瞬时离心后将离心管置于磁力架上，室温静置 2~5 min 至磁珠成团贴壁、液体变清澈；
- (4) 保持离心管于磁力架上，避免震动，用移液器沿液面小心吸去液体，尽量吸尽残余液体，注意枪头不要碰到磁珠。

70%乙醇洗涤

- (1) 每管加入 700 μ L 70%乙醇；
- (2) 涡旋振荡 30 s 重悬磁珠；
- (3) 瞬时离心后将离心管置于磁力架上，室温静置 2~5 min 至磁珠成团贴壁、液体变清澈；
- (4) 保持离心管于磁力架上，避免震动，用移液器沿液面小心吸去液体，尽量吸尽残余液体，注意枪头不要碰到磁珠；

- (5) 重复上面第 1~3 步；
- (6) 保持离心管于磁力架上，室温静置 5~10 min 晾干洗涤液。

注意：肉眼随时注意观察，根据磁珠状态可调整晾干时间，以磁珠表面呈微微湿润状为宜，防止磁珠干裂贴壁。

洗脱

- (1) 将离心管转移至离心管架上，加入 100 μ L Myco Elution Buffer；
- (2) 涡旋振荡使磁珠充分重悬于 Myco Elution Buffer 中；
- (3) 孵育后 70°C 孵育 15 min，孵育过程中每间隔 5 min 可涡旋振荡混匀一次；
- (4) 孵育完成后将离心管置于离心管架上，待温度恢复至室温，瞬时离心；
- (5) 将离心管置于磁力架上静置 2~5 min 至磁珠成团贴壁、液体变清澈；
- (6) 用移液器沿液面小心吸取液体转移到新离心管，注意枪头不要碰到磁珠。
- (7) 做好标记，随即可进行样本检测。如不能立即进行测试，纯化液于 -20°C~-80°C 条件下暂时保存。

操作注意事项

- 在磁力架上分离磁珠时，中途可适当左右旋转离心管，使磁珠吸附更加集中。也可根据实际情况，适当延长或缩短磁吸时间；
- 在提取过程中，移液前后应注意及时更换枪头。不同样本管不要同时开盖，避免交叉污染；
- 每次涡旋振荡后需用迷你离心机瞬时离心，以收集附着在离心管管盖和管壁上的液体和磁珠，降低 DNA 的损失；
- 尽量在完成样本 DNA 提取纯化后立即进行后续的 DNA 检测，以保证检测结果的准确性。

核酸提取纯化仪提取操作步骤

试剂分装（适用于直列式提取仪）（按实际机型调整，示例机型 1/5/7/11 为加热列）

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

- (1) 列1/7：采用蛋白消化方案A每孔加入300 μ L异丙醇、15 μ L *Myco* Magnetic Beads、200 μ L *Myco* Lysis Buffer 2；采用蛋白消化方案B每孔加入300 μ L异丙醇、15 μ L *Myco* Magnetic Beads；
- (2) 列2/8：700 μ L *Myco* Wash Buffer/孔（使用前检查是否加入无水乙醇）；
- (3) 列3/9：1 mL 70%乙醇/孔；
- (4) 列4/10：1 mL 70%乙醇/孔；
- (5) 列5/11：100 μ L *Myco* Elution Buffer/孔（注意：液体加到深孔板底部）；
- (6) 列1/7：加入蛋白消化后全部样本（注意：不要有液体残留）。

试剂分装（适用于轮盘式提取仪）

按照以下深孔板排布预先加入相应溶液，其中：

- (1) 第一块板（Banding）：采用蛋白消化方案A每孔加入300 μ L异丙醇、15 μ L *Myco* Magnetic Beads、200 μ L *Myco* Lysis Buffer 2及蛋白消化后全部样本；采用蛋白消化方案B每孔加入300 μ L异丙醇、15 μ L *Myco* Magnetic Beads及蛋白消化后全部样本；
- (2) 第二块板（Wash1）：700 μ L *Myco* Wash Buffer/孔（使用前检查是否加入无水乙醇）；
- (3) 第三块板（Wash2）：1 mL 70%乙醇/孔；
- (4) 第四块版（Wash3）：1 mL 70%乙醇/孔；
- (5) 第五块板（Elution）：100 μ L *Myco* Elution Buffer/孔（注意：液体加到深孔板底部）。

自动化程序设置

(1) 按以下程序进行自动化提取实验：

| 步骤 | 槽位/板 | 名称 | 等待时间 (min:ss) | 混合时间 (min:ss) | 磁吸时间 (min:ss) | 混合速度 | 体积 (μL) |
|----|------|------|------------------|------------------|------------------|------|------------|
| 1 | 1 | 结合 | 00:00 | 10:00 | 00:50×3 | 中速 | 1000 |
| 2 | 2 | 洗涤 1 | 00:00 | 01:00 | 00:50×3 | 中速 | 700 |
| 3 | 3 | 洗涤 2 | 00:00 | 01:00 | 00:50×3 | 中速 | 1000 |
| 4 | 4 | 洗涤 3 | 00:00 | 01:00 | 00:50×3 | 中速 | 1000 |
| 5 | 5 | 洗脱 | 03:00 | 10:00 | 00:50×3 | 自定义* | 100 |
| 6 | 4 | 弃磁珠 | 00:00 | 00:10 | 00:00 | 快速 | 1000 |

*混合方式：Bottom Mix 01:00+底部暂停 09:00

(2) 加热温度设置：洗脱温度70℃，洗脱（第5步）开始加温步骤；

(3) 自动化程序结束后，将第5及11列/板5的洗脱液转移至干净的无核酸酶离心管中，待用。

操作注意事项

- 磁珠使用前需振荡混匀，加样时尽量加到液面以下，避免磁珠粘附在深孔板壁上；
- 100 μL Myco Elution Buffer 要加到深孔板底部；
- 建议先分装试剂，最后加入蛋白消化后样本；
- 阴性与阳性样本布板时分区，可分布在深孔板不同列、不同板；或在不同时间段进行核酸提取；
- 试剂加入后需立即进行抽提，如需放置，可贴封口膜防止乙醇及异丙醇挥发；
- 提取结束后，及时将第 5 及 11 列/板 5 的洗脱液转移至干净的无核酸酶离心管中，避免挥发；
- 尽量在完成核酸提取后立即进行 DNA 检测，以保证检测结果的准确性。

免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。