

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	150 μ L	150 μ L \times 2	150 μ L
	Proteinase K Buffer	450 μ L	450 μ L \times 2	450 μ L
	5M NaCl	750 μ L	750 μ L \times 2	750 μ L
	Myco Lysis Buffer 2	3 mL	6 mL	3 mL
	Myco Magnetic Beads	225 μ L	225 μ L \times 2	225 μ L
	Myco Wash Buffer	8 mL	15 mL	8 mL
	Myco Elution Buffer	1.5 mL	1.5 mL \times 2	1.5 mL
Box 2	Proteinase K	300 μ L	300 μ L \times 2	300 μ L

储存条件：Box 1 组分室温保存，Box 2 组分-40~-18°C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

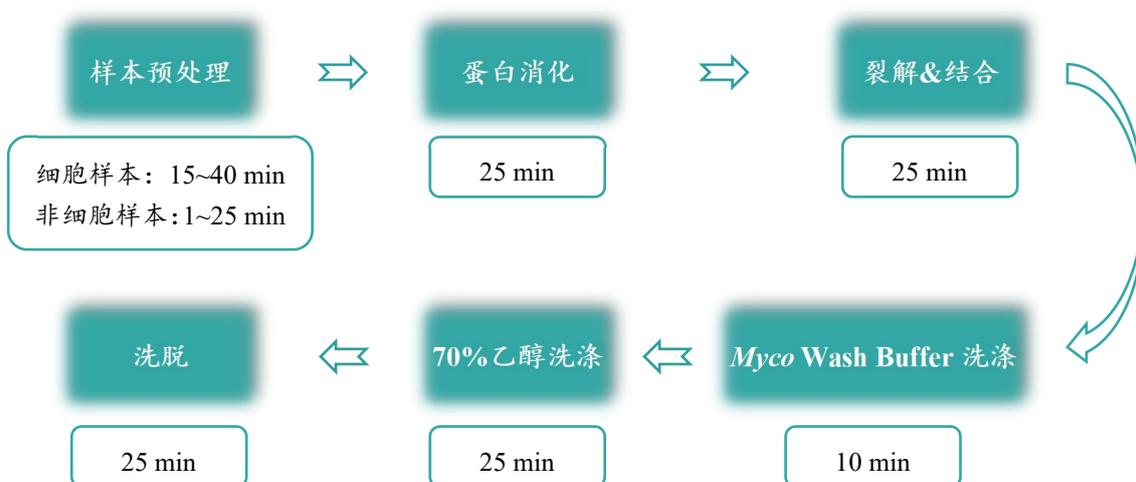
- 高速离心机；
- 漩涡振荡器；
- 磁力架；
- 迷你离心机；
- 金属浴；
- 1.5 mL 无菌低吸附离心管；
- 无菌低吸附带滤芯枪头；
- 无水乙醇（AR）；
- 异丙醇（AR）；
- 无菌PBS溶液（0.15M，pH7.2）；
- 灭菌超纯水（PCR级）。

试剂盒首次使用

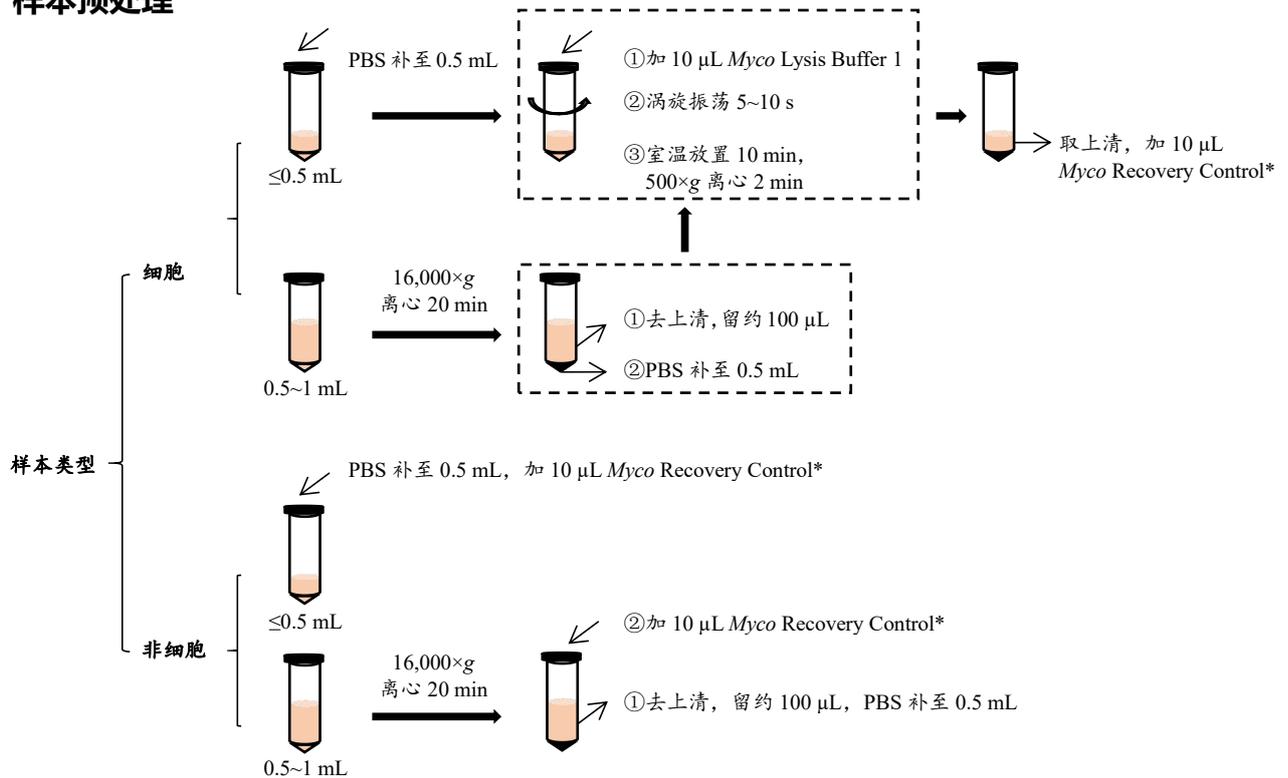
- Proteinase K Buffer、5M NaCl、*Myco* Lysis Buffer 2和*Myco* Wash Buffer若出现沉淀或结晶，可37°C孵育5~10 min以溶解沉淀或结晶；
- 使用前，请根据标签提示向*Myco* Wash Buffer中加入相应体积的无水乙醇；
- 70%乙醇现用现配。使用灭菌超纯水配制，配制后应密封，防止乙醇挥发。

| 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 μL *Myc* 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 μL *Myc* 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) 向剩余液体中加入10 μL *Myc* Recovery Control。

- **对照组**

- A. 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;
- B. 阳性对照样本 (PCS): 建议对试剂盒进行方法学验证时设置阳性对照样本, 参考以上样本预处理步骤制备含RC的阳性对照样本, 可监测支原体DNA提取纯化及检测全过程, 避免假阴性。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。

注意: 建议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

- (1) 每管分别加入 30 μL Proteinase K Buffer、50 μL 5M NaCl 和 20 μL 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。

裂解&结合

- (1) 每管分别加入 200 μL *Myc* Lysis Buffer 2 和 300 μL 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 μL *Myc* Magnetic Beads, 室温涡旋振荡离心管 10 min;

注意: *Myc* 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) 漩涡振荡 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) 瞬离后 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。

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。