MycoSEQ™ Plus Mycoplasma Detection Kit

产品说明书

操作步骤

一、适用范围

本标准操作规程适用于使用 GeticoSEQ™ Plus 支原体检测试剂盒，结合相关核酸提取试剂盒及特定的实时 PCR 检测软件，对复杂生物生产样品中的支原体进行检测的实验操作。此规程详细涵盖了从样本准备、核酸提取到 PCR 检测等各个环节，旨在确保检测结果的准确性和可靠性。

二、检测原理

GeticoSEQ™ Plus 支原体检测试剂盒基于 TaqMan™技术的定量 PCR（qPCR）方法。该技术利用特定的引物和探针，对样品中的支原体 DNA 进行特异性扩增和检测。在反应体系中，试剂盒包含了内部对照，其作用是实时监测 PCR 反应过程中是否存在抑制情况。同时，试剂盒还提供外部检测特异性对照模板，可用于准确区分污染事件和真正的阳性样本，从而提高检测结果的可信度。

三、试剂盒组成与储存

（一）GeticoSEQ™ Plus 支原体检测试剂盒

内容物	瓶盖颜色	储存条件	说明
GeticoSEQ™ Plus qPCR 10X 检测混合液	绿色	-25°C 至 -15°C	包含用于支原体 DNA 扩增和检测的引物和探针，以及内部对照相关成分
阴性对照	白色	首次解冻前 -25°C 至 -15°C，首次解冻后 2 - 8°C	用于检测实验过程中是否存在污染，确保实验环境和试剂的纯净度
2x qPCR Master Mix Plus	蓝色	-25°C 至 -15°C	提供 PCR 反应所需的酶、缓冲液等基本成分，保证反应的顺利进行
GeticoSEQ™ Plus 鉴别阳性/提取对照（1,000 copies/μL）	红色	-25°C 至 -15°C	可作为阳性提取对照 (PEC) 和阳性模板对照（PTC），用于验证试剂和系统性能，评估 DNA 提取和检测效率
DNA 稀释缓冲液	澄清	首次解冻前 -25°C 至 -15°C，首次解冻后 2 - 8°C	用于稀释样本或对照，以达到合适的检测浓度

（二）PrepSEQ™ 1 - 2 - 3 支原体核酸提取试剂盒

内容物	储存条件	说明
细胞裂解缓冲液	2°C 至 8°C	用于裂解细胞，释放出核酸，同时可限制宿主细胞核裂解，适用于含哺乳动物细胞的样本
RNase Cocktail™酶混合物	-25°C 至 -15°C	可降解样本中的 RNA，减少 RNA 对后续检测的干扰
PrepSEQ™裂解缓冲液	18 - 25°C（室温）	用于裂解支原体等微生物，释放其核酸
结合溶液（需自行配制）	18 - 25°C（室温）	使用前需向空瓶中加入异丙醇，用于核酸与磁性颗粒的结合
洗涤缓冲液浓缩液（需自行配制）	使用前需加入乙醇，18 - 25°C（室温）	用于洗涤结合了核酸的磁性颗粒，去除杂质
洗脱缓冲液	无特殊说明	用于将结合在磁性颗粒上的核酸洗脱下来，得到纯净的核酸溶液
蛋白酶 K 缓冲液	无特殊说明	为蛋白酶 K 提供合适的反应环境
蛋白酶 K 缓冲液 II	无特殊说明	辅助蛋白酶 K 发挥作用，提高核酸提取效率
磁性颗粒	18 - 25°C（室温）	用于吸附核酸，通过磁性分离实现核酸的纯化
蛋白酶 K（20 mg/mL）	-25°C 至 -15°C	可消化样本中的蛋白质，使核酸得以释放

（三）PrepSEQ™ Express 核酸提取试剂盒

内容物	储存条件	说明
PrepSEQ™ Express 试剂盒	18 - 25°C（室温），箔面朝上	包含核酸提取所需的多种试剂和耗材，适用于自动化核酸提取流程
裂解管	18 - 25°C（室温）	用于样本的裂解，使核酸释放出来

内容物	储存条件	说明
PrepSEQ™ Express 样品管	无特殊说明	用于盛放样本和相关试剂，进行核酸提取操作
洗脱管	无特殊说明	用于收集洗脱下来的纯净核酸溶液
AutoMate Express™吸头及吸头架	无特殊说明	配合自动化设备使用，确保准确吸取和转移试剂

四、所需材料（未提供）

（一）设备

1. **实时 PCR 系统**：QuantStudio™ 5 实时 PCR 系统（搭配 AccuSEQ™ Software v3.2 或更高版本）或 7500 Fast 实时 PCR 仪器（搭配 AccuSEQ™ Real - Time PCR Detection Software v2.2 或更高版本），用于对核酸样本进行扩增和实时检测。
2. **涡旋混合器**：用于混合试剂和样本，使成分均匀分布。
3. **微量管离心机**：可对微量管中的样本进行离心操作，实现固液分离等目的。
4. **50 - mL 管离心机**：最大转速需≥16,000 × g，用于对 50 - mL 管中的样本进行高速离心，如收集支原体沉淀。
5. **2 - mL 管加热块**：用于对 2 - mL 管中的样本进行加热孵育，满足特定反应的温度要求。
6. **Vortex Adapter - 60**：辅助涡旋混合器对多个样本进行高效混合。
7. **16 位磁性支架**：如 DynaMag™ - 2 Magnet 或等效产品，用于分离结合了核酸的磁性颗粒。
8. **自动化 DNA 提取设备**：AutoMate Express 仪器（用于 PrepSEQ Express 核酸提取试剂盒）或 KingFisher™ Flex 纯化系统（搭配 96 Deep - Well Head，用于 PrepSEQ™ 1 - 2 - 3 支原体核酸提取试剂盒自动化流程），可提高核酸提取的效率和准确性。

（二）通用耗材

1. **一次性手套**：防止实验人员的手部污染样本和试剂，同时保护实验人员免受样本中可能存在的有害物质的侵害。
2. **防气溶胶移液器吸头**：避免移液器在吸取和转移试剂过程中产生气溶胶，减少交叉污染的风险。
3. **移液器**：包括正压、空气置换、多通道、重复（1 µL - 1 mL）等不同类型，用于准确吸取和转移各种试剂和样本。
4. **2.0 - mL Safe - Lock 管（圆底）**：用于盛放样本和试剂，进行反应和储存。
5. **50 - mL 锥形管**：用于收集和处理较大体积的样本，如细胞培养上清液。
6. **无 RNase 微量离心管（1.5 mL）**：确保样本在处理过程中不受 RNA 酶的污染，保证核酸的完整性。
7. **0.5 M EDTA**：可用于螯合金属离子，抑制核酸酶的活性，保护核酸。
8. **磷酸盐缓冲盐水（PBS）**：用于阴性提取对照，模拟样本的生理环境。
9. **RNase AWAY™表面去污剂或等效产品**：用于清洁实验室工作台和设备，去除 RNA 酶污染，保证实验环境的纯净。

（三）手动样品提取耗材

1. **95% 乙醇**：用于洗涤结合了核酸的磁性颗粒，去除杂质。
2. **>99% 异丙醇**：用于配制结合溶液，促进核酸与磁性颗粒的结合。

（四）实时 PCR 仪器耗材

1. **MicroAmp™ Fast Optical 96 孔反应板（带条形码，0.1 mL）**：用于放置 PCR 反应体系，进行核酸扩增和检测。
2. **MicroAmp™光学粘性膜**：用于密封反应板，防止反应体系蒸发和污染。
3. **MicroAmp™粘性膜涂布器**：辅助将光学粘性膜均匀地贴在反应板上。
4. **MicroAmp™ 96 孔板底座**：为反应板提供稳定的支撑，便于操作和检测。

五、样本制备与 PCR 指南

（一）防止污染指南

1. **试剂与样本分开存放**：将试剂盒试剂与 DNA 样本存放在不同的区域，避免相互污染。
2. **专用工作区域和设备**：使用单独、清洁且指定的工作区域和设备（最好是单独的 PCR 通风橱）来制备 DNA 模板和 PCR 主混合液。这些区域和设备应定期进行清洁和消毒，以减少交叉污染的可能性。
3. **避免扩增产物污染**：不要将扩增产物带入反应设置区域，防止扩增产物污染后续的反应体系。
4. **个人防护**：佩戴干净的手套、实验室外套和防护眼镜，防止实验人员的身体接触污染样本和试剂。在扩增和制备反应之间，不要重复使用手套和外套。如果怀疑手套被污染，应立即更换。
5. **移液器使用**：使用正压移液器或防气溶胶屏障移液器吸头，避免在吸取和转移试剂过程中产生气溶胶，导致交叉污染。
6. **样本管操作**：制备未知样本时，使用低吸附或硅化的微量管。小心打开和关闭所有样本管，避免样本飞溅或喷雾。尽可能保持反应和组件密封，减少与外界环境的接触。
7. **设置对照**：始终设置无模板对照（NTC）反应，即在反应体系中不加入样本 DNA，仅加入试剂，用于检测实验过程中是否存在污染。
8. **扩增后处理**：扩增完成后，不要打开反应板，因为打开反应板会增加后续反应被扩增产物污染的风险。
9. **实验室清洁**：定期使用核酸去污溶液（如 RNase AWAY™表面去污剂）清洁实验室工作台和设备，去除残留的核酸污染。

（二）制备含靶 DNA 样本裂解液指南

1. **减少背景核酸**：尽量减少最终提取 DNA 中的细胞 DNA 和 / 或 RNA，这对支原体 DNA 检测至关重要。高含量的细胞 DNA 和 / 或 RNA 会导致 PCR 抑制和高背景，降低对低拷贝靶标的检测能力。可以通过优化提取方法、选择合适的裂解缓冲液等方式来实现。
2. **样本活力**：使用新鲜的培养样本，以提高提取靶 DNA 的纯度。避免在 4°C 长期储存（>4 天）或冷冻温度等条件，这些温度会导致细胞死亡或裂解增加，从而增加样本中的背景 DNA。
3. **细胞沉淀处理**：在批放行方案中，处理哺乳动物细胞沉淀时，将沉淀置于冰上，并在 4°C 进行所

有处理步骤，以尽量减少宿主细胞核裂解。在室温下处理会增加细胞核裂解和最终提取 DNA 中的宿主 DNA，导致提取效率降低。

4. **混合样本处理**：在含有混合上清液和哺乳动物细胞的批放行方案中：
    - 使用细胞裂解缓冲液来限制宿主细胞核裂解，该缓冲液可裂解支原体细胞膜，但使宿主细胞核保持完整。
    - 某些情况下，细胞沉淀较大且粘稠，难以重悬，切勿涡旋重悬细胞，以免造成细胞核破裂。
    - 转移细胞培养上清液时，避免接触沉淀，沉淀中含有细胞核和可能由细胞核裂解产生的粘性物质。如有需要，使用 P200 移液器进行转移。
    - 在最终转移细胞沉淀上清液时，避免接触或转移粘性物质。如有需要，在 4°C 以 1000 × g 离心 3 分钟，然后用 P200 移液器非常小心地转移 300 µL（两个 150 - µL 等分试样）。

（三）提取对照指南

1. **对照作用**：GeticoSEQ™ Plus 鉴别阳性 / 提取对照可作为阳性提取对照（PEC）和阳性模板对照（PTC）。PEC 用于验证试剂和系统性能，评估从测试样本中提取和检测 DNA 的效率；PTC 用于验证 PCR 反应的有效性。
2. **对照设置**：若每个样本都进行 PEC 检测，建议每个测试样本提取并分析 1 个无对照复制品和 1 个有对照复制品。

六、样本提取

（一） 手动样本提取（使用 PrepSEQ™ 1 - 2 - 3 支原体核酸提取试剂盒）

1. 准备试剂

- **结合溶液**：向空的结合溶液瓶中加入适量的 100% 异丙醇，充分混合后标记瓶子，表明已加入异丙醇。异丙醇的作用是促进核酸与磁性颗粒的结合。
- **洗涤缓冲液**：向洗涤缓冲液浓缩液瓶中加入适量的 95% 非变性乙醇，充分混合后标记瓶子，表明已加入乙醇。洗涤缓冲液用于去除结合在磁性颗粒上的杂质，保证核酸的纯度。

2. 准备磁性颗粒

每次使用前，将磁性颗粒在 37°C 孵育至少 10 分钟，期间以 7 档涡旋振荡，直至颗粒完全悬浮。对于难以重悬的珠子，可能需要延长加热和涡旋时间。确保磁性颗粒均匀悬浮是保证核酸提取效率的关键步骤。

3. 操作磁性颗粒指南

- **沉淀方向**：将样本管放入磁性支架时，始终使磁性颗粒沉淀朝向磁铁，以确保磁性颗粒能够快速、有效地被吸附。
- **捕获时间**：除非另有说明，DNA 捕获在磁性支架中约 1 分钟即可完成。但对于一些特殊样本，可能需要适当延长时间。
- **分离操作**：分离液相或洗脱液与磁性颗粒时，不要扰动颗粒，因为颗粒残留会抑制 PCR 反应。可以使用移液器小心地吸取液相或洗脱液。

- **洗涤注意事项**：洗涤步骤中，无需使颗粒从管壁脱离，颗粒附着在管壁上不影响 DNA 回收。部分样本会使颗粒牢固附着在管壁上，而有些样本中的颗粒在涡旋时易形成松散聚集体并脱落。在洗脱步骤中，加热和涡旋时颗粒必须分散成浆液，以保证核酸能够充分洗脱。

3. 不同样本类型的提取步骤

Option 1：生产收获上清液或废弃培养基的批放行方法（手动提取）

适用于细胞治疗应用和其他无细胞或细胞数 $< 1 \times 10^6$的生产收获过程的批放行检测。若运行 S - PEC，每个样本准备 2 管。

1. （仅适用于细胞治疗应用）向适量的样本（置于合适的容器）中加入一定数量（约 200,000 个）的细胞，然后进行下一步操作。这一步是为了模拟实际样本中的细胞环境。
2. 向容器中加入适量的样本，在 4°C 以 1,000 × g 离心 5 分钟。此步骤的目的是沉淀哺乳动物细胞，将其与上清液分离。
3. 使用移液器将上清液转移至新的容器，避免扰动哺乳动物细胞沉淀，将上清液置于冰上，丢弃沉淀。这一步确保上清液中不含有哺乳动物细胞，减少背景干扰。
4. 在 4°C 以 16,000 × g 离心上清液 30 分钟，以收集支原体。高速离心可以使支原体沉淀下来。
5. 小心移除并丢弃上清液，避免接触或扰动支原体沉淀，用移液器小心去除剩余液体。确保支原体沉淀不受损失。
6. 向支原体沉淀中加入适量的 PrepSEQ™裂解缓冲液，轻轻涡旋 5 秒使其完全重悬。若沉淀难以移取，可适当剧烈振荡管子。裂解缓冲液可以裂解支原体，释放出核酸。

Option 2：生产收获混合上清液和哺乳动物细胞的批放行方法（手动提取）

适用于单克隆抗体应用和其他细胞数 $> 1 \times 10^6$的生产收获过程的批放行检测。若运行 S - PEC，每个样本准备 2 管。

1. 向容器中加入适量的样本，在 4°C 以 1,000 × g 离心 5 分钟。这一步是为了将上清液和哺乳动物细胞沉淀分离。
2. 使用移液器将上清液转移至新的容器，避免扰动哺乳动物细胞沉淀，将上清液置于冰上。
3. 去除沉淀中的残留上清液，将沉淀置于冰上用于下一步操作。
4. 在 4°C 以 16,000 × g 离心上清液 30 分钟，收集支原体。
5. 小心移除并丢弃上清液，避免接触或扰动支原体沉淀，用移液器小心去除剩余液体，保留支原体沉淀用于后续操作。
6. 向哺乳动物细胞沉淀中加入适量的细胞裂解缓冲液，轻轻涡旋 5 秒使其完全重悬。若沉淀难以移取，可适当剧烈振荡管子。细胞裂解缓冲液可以裂解支原体细胞膜，但使宿主细胞核保持完整。
7. 将细胞悬液转移至合适的管中，置于冰上 10 分钟。这一步是为了让细胞裂解充分进行。
8. 在 4°C 以 1,500 × g 离心管 10 分钟，收集细胞膜和细胞核。
9. 小心将含有细胞裂解物的上清液转移至之前保留的支原体沉淀中