

# M5 One-step Quickcolor Mycoplasma Detection Kit 一步法恒温支原体检测试剂盒（溶液型）使用说明书（版本 SQ22）

产品名称	单位	货号
M5 One-step Quickcolor Mycoplasma Detection Kit	1ml	MF441-01

## 【储存条件】

-20℃保存。

## 【产品简介】

哺乳动物细胞的培养，支原体（Mycoplasma）污染是个世界性的问题。支原体污染几乎可以改变细胞的所有参数，导致实验结果的不准确、甚至完全错误。从 2013 年开始，《Nature》期刊已正式要求投稿的文章，如涉及细胞培养都要进行支原体检测。相信会有越来越多的高水平期刊将做出同样的支原体检测要求。培养法是相对可靠的支原体检测技术，但是该方法非常耗时的，需要数周，不适合作为细胞培养液中支原体污染的快速检测。此外，通过固体培养法无法检测污染细胞的一种最常见的支原体，即猪鼻支原体（M.Hyorhinis）。这是因为猪鼻支原体无法在支原体固体培养基上形成可见的菌落。而猪鼻支原体约占所有支原体污染的 20-50%。有的实验室使用荧光染色法检测支原体，但是该方法灵敏度太低，而且严重依赖实验人员的经验，实验的稳定性极差。此外，当该方法检测成阳性时，细胞经常已经严重污染。

目前，细胞培养液中支原体污染的检测通常使用的是 PCR 法。但是 PCR 法也有明显的缺点：（1）整个过程大约需要 3 个小时；（2）由于细胞培养数天后，培养液中经常含有严重抑制 PCR 扩增的代谢物，所以样品的前处理一般是 PCR 法不可或缺的环节；（3）PCR 法的灵敏度有限，通常需要将培养液离心浓缩或者抽提 DNA 后再检测；（4）PCR 产物的电泳，需要用到 EB 等潜在的致癌物质；（5）需要用到 PCR 仪、电泳槽、凝胶成像仪、离心机等仪器。

本试剂盒使用独特的恒温基因扩增技术，彻底解决了上述 PCR 法的缺点：（1）整个检测过程只需 1 小时，大大缩短了检测时间；（2）细胞培养液中的 PCR 抑制剂，不会抑制该产品的恒温基因扩增，所以任何情况下都无需样品的前处理；（3）恒温基因扩增的灵敏度是 PCR 法的 10-1000 倍，检测只需使用 1 μL 的细胞培养液，无需样品的离心浓缩或者进行支原体 DNA 的抽提；（4）恒温基因扩增的产物无需电泳，可以通过指示剂的颜色变化直接肉眼判断反应结果；（5）无需用到 PCR 仪、电泳槽、凝胶成像仪、离心机等仪器，整个检测过程只需一个水浴锅。

经测试，本试剂盒至少可以检测以下 13 种支原体：（1）M.Hyorhinis、（2）M.Fermentans、（3）M.Arginini、（4）M. hominis、（5）M. orale、（6）M. salivarium、（7）M.pirum、（8）Acholeplasma Laidlawii、（9）M. agalactiae、（10）M.bovis、（11）M. buccale、（12）M. arthritis、（13）M. pulmonis（注：M.为 Mycoplasma 的缩写）。其中，前 8 种为是最常见的污染细胞的支原体种类，约占污染细胞的支原体的 98%左右。以上 13 种约占污染细胞的支原体种类的 99%左右。

注意：本试剂盒无法检测 Ureaplasma Urealyticum 支原体（注：该支原体污染细胞的概率极低）！

如果您想得到 100%正确的支原体检测结果（比如，开展细胞治疗的客户，进行干细胞培养的客户，生产血清、胰酶、培养液的客户，出售各种原代培养细胞系和肿瘤细胞系的客户等），任选本公司生产的《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《发光法支原体检测试剂盒》中的两种进行检测，将会得到比较满意的结果，检测的正确率应该在 99.9%以上。如果同时使用这三种试剂盒进行检测，检测的正确率应该在 99.99%以上。

## 【注意事项】

1. 请确保样品加入后，反应之前：阴性、阳性和所有待测样品的颜色基本一致。如果个别样品，一旦加入，反应管的颜色就与阴性、阳性明显不同，说明其中含有可干扰本系统正常指示效果的物质，必须先去除。此现象曾经在检测 CHO 无血清培养基上发生过。常见的 DMEM、MEM、F12、1640 等培养基不会发生该现象。去除方法：取 1 mL 细胞上清，先 13000 rpm 离心 5 min，吸走 950 μL 上清；加 PBS 950 μL，再次离心，吸走 950 μL 上清；再加 PBS 950 μL，第三次离心，吸走 950 μL 上清；吹匀剩余的 50 μL，取 1 μL 进行检测。
2. 由于恒温扩增所用的各种酶强烈依赖溶液中的二价离子，待测样品的 EDTA 等金属离子螯合剂只能微量存在。本试剂盒建议直接使用细胞上清进行检测，不建议提取支原体 DNA。如果打算用试剂盒提取支原体 DNA，请用去离子水溶解 DNA。

### 3. 防 DNA 污染注意事项：

- (1) 强烈建议使用滤芯吸头（比如 Axygen 滤芯吸头）吸取相关溶液和阳性支原体等。如果没有滤芯吸头，至少应该使用新开封的吸头。
  - (2) 必须确保使用的移液枪本身没有残留的支原体。因此，最好使用全新购买的移液枪。如果没有新购买的移液枪，至少应该使用以前没有进行过细胞培养的移液枪。因为进行过细胞培养的移液枪极有可能被含支原体的培养液污染（如细胞培养时，不小心将含支原体污染的培养液吸入移液枪的枪体内）。由于本试剂盒非常灵敏，移液枪中吸附的支原体有可能造成不必要的假阳性。
  - (3) 样品前处理的各种吸头、离心管，以及吸取阳性对照 DNA、待测样品 DNA 的吸头，务必小心处理，请将其装入含有半瓶水的带盖的、可密封的瓶子内，全部样品吸取完后，盖上瓶盖，以防止阳性 DNA 的挥发，造成环境的污染，进而造成假阳性。
  - (4) 整个操作过程，最好不要说话，因为人的口腔和唾液都是带支原体的。
4. 如发现细胞被支原体污染，本公司提供细胞专用支原体清除试剂。
5. 血清的支原体检测有特殊性，请参考本公司《发光法支原体检测试剂盒》说明书中最后的注意事项部分。

### 【产品组成】

- (1) 溶液 1：1150  $\mu\text{L}$ （50 次检测）；
- (2) 溶液 2：50  $\mu\text{L}$ （50 次检测）；
- (3) 溶液 3：指示剂，50  $\mu\text{L}$ ；
- (4) 阳性支原体 DNA：50  $\mu\text{L}$ ；
- (5) 矿物油：1500  $\mu\text{L}$ 。

### 【操作步骤】

1. 待测样品的准备：为了准确判断细胞是否有支原体的污染，待测的细胞培养液样品最好来源于至少培养三天且汇合度在 70-90% 左右的细胞培养上清（贴壁细胞），无需离心。悬浮培养的细胞也需要在换液传代后，至少让细胞生长 3 天再取培养液进行检测，也无需离心。哺乳动物细胞的存在不会影响检测结果。

**注：**收集的待测细胞培养液样品如果不立即检测，请放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存，不得放于室温或  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱。样品在  $-20^{\circ}\text{C}$  至少可以保存一个月，在  $-80^{\circ}\text{C}$  可以长期保存。此外，为了节约检测成本，可以将不同时间收集的样品放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存，而后一起检测。

2. 反应体系的配制（操作之前，请认真看完后文的注意事项后，再进行操作。）：

- (1) 将溶液 1 和溶液 3 从  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出，室温融化，轻轻甩动离心管（或高速离心一下），将管壁溶液甩到管底，吹吸均匀后（**注：溶液 1 和溶液 3 都必须吹吸均匀**），按表 1 进行反应体系的配制：

表 1：恒温反应体系的配制

	单个样品体积	样品总数	总体积
溶液 1	23 $\mu\text{L}$	N	$23 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$
溶液 2	1 $\mu\text{L}$	N	$1 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$
溶液 3	0.15 $\mu\text{L}$	N	$0.15 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$

举例：如果待测样品为 3 个（加上 1 个阴性和 1 个阳性对照），则样品总数为 5 个。溶液 1 的总体积为  $23 \times 5 \times 1.08 = 124.2 \mu\text{L}$ 。溶液 2 的总体积为  $1 \times 5 \times 1.08 = 5.4 \mu\text{L}$ 。溶液 3 的总体积为  $0.15 \times 5 \times 1.08 = 0.81 \mu\text{L}$ 。将溶液 1、溶液 2 和溶液 3 混合均匀即可。

**注：**1) 溶液 1 和溶液 3 使用完后，请继续放回  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存；2) 溶液 2 必须一直在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存【溶液 2 在  $-20^{\circ}\text{C}$  不会冻住】，不能放于室温；3) 溶液 2 和溶液 3 开盖之前，请高速离心一下；4) 总体积中多配制 8%，是为了防止移液误差，以保证每个反应管中的反应液足量。

- (2) 将上述配制好的恒温反应体系，吹打均匀后，按每管 24  $\mu\text{L}$  分装到 0.2 mL 的 PCR 管中。

**注：**1) 尽量保证每管的反应液体积一样；2) PCR 管应该使用透明度良好的薄壁 PCR 管。

(3) 阴性对照管(Negative)可以不加,也可以加入 1  $\mu\text{L}$  灭菌水;往测试管(Test)中加入 1  $\mu\text{L}$  待测细胞培养液;往阳性对照管(Positive)中加入 1  $\mu\text{L}$  阳性支原体 DNA。反应液的总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。

**注: 1) 装有阳性支原体 DNA 的螺口管请不要高速离心, 开盖之前, 只要用手指捏住, 用力甩一下即可; 2) 进行反应体系配制的房间, 与样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间最好分开。**

### 3. 反应:

选择以下方式之一进行反应:

(1) 水浴内反应 (注意: 本产品不能在金属水浴内反应!): 往每个反应管内加入 25  $\mu\text{L}$  矿物油, 以防止水份挥发, 盖上盖子, 将反应管插入带孔的漂板内, 放入已经升温到 61 $^{\circ}\text{C}$  的水浴内, 准确反应 60 分钟。

**注: 在反应之前, 水浴锅必须先升温到 61 $^{\circ}\text{C}$ , 再放入反应管。此外, 必须用水银温度计测量水温, 确保水浴锅的温度准确。本试剂盒所用的酶对温度非常敏感, 只允许仪器显示温度与实际温度的温差不超过 1 $^{\circ}\text{C}$ 。**

(2) PCR 仪上反应: 有 PCR 仪的实验室, 强烈建议在 PCR 仪上进行反应, 这样可以准确控制反应的时间和温度。PCR 仪参数如下: 61 $^{\circ}\text{C}$ , 60 min; 10 $^{\circ}\text{C}$ , forever; 热盖温度, 100  $^{\circ}\text{C}$ 。

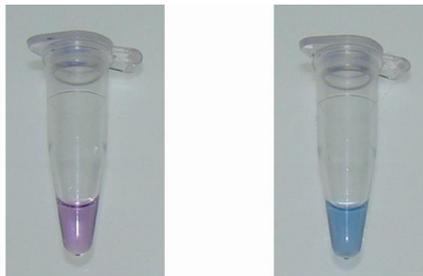
**注: 在带热盖的 PCR 仪上进行反应, 无需在反应管内加入矿物油。**

4. 结果判断: 61 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟后, 立刻取出反应管, 放于室温。以一张白纸或白色泡沫盒 (优选白色泡沫) 为背景, 通过反应管溶液颜色的变化, 即可判断检测结果。如果溶液为蓝绿色, 则说明有支原体污染; 如果为紫红色, 则说明没有支原体污染 (如图 1)。

**注 1: 在 61 $^{\circ}\text{C}$  反应的时间必须准确计时, 超过说明书规定的反应时间可能会出现假阳性 (最多不得超过 5 分钟)。如果试剂盒已经过期或者发生其他意外情况影响酶活性时, 万一发现: 61 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟后, 阳性不呈明显的蓝绿色, 可以考虑将已经反应 60 分钟的反应管, 继续在 61 $^{\circ}\text{C}$  的水浴或 PCR 仪上反应 15 分钟。但是如果 61 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟后, 阳性已经呈现明显的蓝绿色并且阳性与阴性的区别一眼就可以看出, 不得继续反应, 否则可能出现假阳性。以上只是意外情况下的补救措施。**

**注 2: 如果反应后, 发现个别样品的颜色介于阳性和阴性之间, 可以将这些样品单独继续 61 $^{\circ}\text{C}$  反应 10 分钟。10 分钟后, 如果其颜色仍然与阳性对照的颜色不同, 该样品应该判为阴性。**

**注 3: 反应后, 请勿打开反应管的盖子, 否则有可能造成检测环境的污染。结果判断完后, 将其用自封袋密闭, 扔到另外一个房间的垃圾桶内。**



Negative reaction

Positive reaction

图 1. 左边为阴性反应结果, 右边为阳性反应结果。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。