

# M5 HiPer Luminescence Mycoplasma Detection Kit

## 发光法支原体检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Luminescence Mycoplasma Detection Kit	50T	MF440-01

### 【储存条件】

产品为冻干品，随干冰或冰袋运输，收到产品后，溶解之前，请放-80℃冰箱低温保存。该条件下，至少可以保存5年。溶解之前，放-20℃冰箱，可以短期保存1-2个月。有条件，请尽量放-80℃冰箱保存。当冻干品溶解后，在冰上操作，按每管50μL分装到1.5mL离心管中，分装后，立即在-80℃冰箱低温保存。该条件下，至少可以保存3年。注意：冻干品溶解后不能放-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（支原体污染对细胞的详细危害，请参考本公司的网站：[www.yisemed.com](http://www.yisemed.com)）。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，当检测成阳性时，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法不可或缺的一环；（3）PCR产物的电泳，需要用到EB等潜在的致癌物质。本公司已经开发出了专用于体外细胞培养的《一步法恒温支原体检测试剂盒》，与PCR法支原体检测相比，其具有许多优点：耗时短、灵敏度高、操作简单、不会被细胞代谢产物抑制、结果无需电泳肉眼可直接判断等。

尽管如此，《一步法恒温支原体检测试剂盒》可能也有个小缺点：因为《一步法恒温支原体检测试剂盒》需要至少同时使用4条引物才能完成扩增，其引物设计相对困难。虽然经我们测试，该试剂盒至少可认识其说明书中列举的13种支原体，而这13种支原体大约占污染细胞的支原体种类的99%左右。但是，不排除《一步法恒温支原体检测试剂盒》无法识别个别在体外细胞培养中出现概率极低的支原体。为此，我们特意开发了具有广谱识别能力的《PCR法支原体检测试剂盒》作为补充。此外，作为支原体检测领域的共识：单独使用目前市面上的任何一种支原体检测试剂盒，都无法做到100%正确，既不会漏检（假阴性），也不会多检（假阳性）。严格的支原体检测，至少需要使用两种，最好使用三种不同原理的支原体检测方法同时进行检测，才能使检测结果接近100%正确。为了进一步满足支原体快速检测市场的需求，我们特意开发了第三种支原体检测试剂盒，即《发光法支原体检测试剂盒》。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。如果将所有待测样品统一接种到支原体液体培养基，然后在37℃培养箱中培养3天后，再用本公司三种支原体检测试剂盒同时进行检测，则基本可以确保您的检测结果100%正确！通过将待测样品接种到支原体液体培养基培养3天的目的是：防止一些支原体含量极其微量的待测样品（比如：细胞培养用的血清、胰酶、抗生素、培养液和极个别的细胞培养上清），如果不经过大量繁殖，有可能漏检。

### 【产品用途】

专门用于检测体外培养的哺乳动物细胞是否被支原体污染。

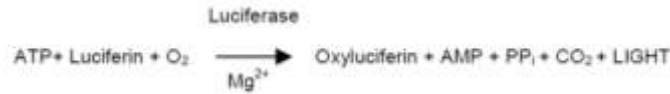
### 【产品组成】

- 1、支原体检测溶液：5.5 mL
- 2、试剂 A(已冻干)：2.5 mL (50 次检测)
- 3、试剂 B(已冻干)：2.5 mL (50 次检测)

注意：本试剂盒不含阳性对照，阳性对照需要单独购买（货号：MF444-01，规格 20T）。

### 【产品原理】

《发光法支原体检测试剂盒》通过检测支原体含有的特异性 ATP 合成相关酶的活性以达到检测体外培养的哺乳动物细胞是否被支原体污染的目的。在支原体裂解后,该支原体特异性的酶,在底物存在下,具有将 ADP 转化成 ATP 的功能。由于荧光素酶 (Luciferase) 催化底物荧光素 (Luciferin) 产生光的反应需要 ATP 的参与,支原体特异性酶催化产生的 ATP 含量,可以通过该反应转化成生物发光 (Bioluminescence) 信号,该信号可以使用专门的发光检测仪 (Luminometer) 或具有发光检测功能的多功能酶标仪进行检测,发光的强度与 ATP 的含量成正比。具体的反应如下:



通过比较细胞培养上清和未用于细胞培养而成分完全相同的培养液二者的支原体特异性酶的含量,即可知道 培养的细胞是否被支原体污染。

### 【产品优点】

- 1、检测时间短。整个检测过程只需 30 分钟左右。
- 2、《发光法支原体检测试剂盒》检测的是活支原体,只有样品中存在活的支原体,才会生产阳性结果,可以区分支原体的死活。而《一步法恒温支原体检测试剂盒》和《PCR 法支原体检测试剂盒》都是检测支原体的 DNA,不论支原体的死活,样品中只要有支原体 DNA 的存在,就会生产阳性结果,所以无法区分支原体的死活。细胞培养中,最关心的是细胞培养液上清或者血清、胰酶等成分中,是否有活的支原体。而如果仅有死的支原体或者一些残存的支原体 DNA,是无关紧要的。
- 3、不存在假阳性。由于《一步法恒温支原体检测试剂盒》和《PCR 法支原体检测试剂盒》都需要对支原体 DNA 进行大量的扩增,检测过程中,只要有微量的支原体 DNA 或者扩增产物的污染,就会出现假阳性。而《发光法支原体检测试剂盒》只检测活的支原体,不存在扩增产物污染样品的问题。
- 4、不存在因反应被抑制导致的假阴性。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,所以使用《PCR 法支原体检测试剂盒》经常会出现假阴性的问题。该问题在《发光法支原体检测试剂盒》不存在。
- 5、《发光法支原体检测试剂盒》对支原体的识别率极高,近 20 种细胞培养中出现过的支原体全部含有该酶,所以这些支原体全部可以被《发光法支原体检测试剂盒》识别。目前为止,100 多种已知的支原体中,只发现这一种支原体不含有该酶,而这种支原体在细胞培养中出现的概率几乎为零,所以该方法支原体的识别率应该在 99.99%以上。

### 【操作步骤】

#### 1、检测试剂的分装和保存

收到的产品为冻干品,溶解前,请放-80 °C冰箱低温保存。第一次使用前,在冰上操作,分别用 2.5 mL 支原体检测溶液溶解试剂 A 和试剂 B (注意:因为试剂 A 和试剂 B 的离心管容量不足 2.5 mL,可以分别先用 1 mL 支原体检测溶液将冻干的试剂 A 和试剂 B 溶解后,转移到一个 5 mL 或 10 mL 的离心管中,再各补加 1.5 mL 支原体检测溶液),按每管 50 μL 分别分装到 50 个 1.5 mL 离心管中,立即放-80 °C冰箱低温保存。

#### 2、阴性对照的设置

本试剂盒每次检测都必须设置阴性对照。阴性对照必须使用配制完后放于 4 °C 冰箱,未用于细胞培养但成分完全相同的培养液,包括其中的血清、抗生素等含量也必须完全相同。特别是其中的血清含量和批次,对发光的本底值影响很大,作为阴性对照的培养液,其中添加的血清,必须与用于细胞培养的血清批次相同且含量完全相同。例如:如果用于细胞培养的培养液为含有 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM,那么阴性对照也应该使用含有相同批次的 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM。如果用于细胞培养的培养液为无血清培养液,那么阴性对照也应该使用无血清但成分相同的培养液。

上述阴性对照的选取是按照最严格的方式进行的,如果确实没有成分完全相同的培养液,也可以使用成分最接近的培养液,比如血清批次可以不同。但是,基础培养基(比如 DMEM 等)一定要相同,虽然批次也可以不同。

#### 3、阳性对照的设置

如果您实验室拥有经其他支原体检测方法(比如本公司的《一步法恒温支原体检测试剂盒》或者《PCR 法支原体检测试剂盒》等)检测为阳性的细胞系,其培养 3 天后的上清即可以直接按照后文的样品准备方法,自己制备阳性对照。

如果您没有上述阳性样品,那么阳性对照也可以从我们公司单独购买(货号:LPC10,规格 40 次)。如果第一次使用《发光法支原体检测试剂盒》,建议购买一支本公司的《发光法支原体检测试剂盒阳性对照》。

4、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 3 天（注：培养 3 天是最可靠的做法。当然，如果支原体污染比较严重，培养 1-2 天也可以满足检测的需要）且汇合度在 70-90%左右的细胞培养液上清（贴壁细胞）。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。具体操作如下（请严格按照相应的体积进行操作）：

（1）取 180  $\mu\text{L}$  上述待测样品，在普通台式离心机上 200 g（大约 1500 rpm）低速离心 5 分钟，准确吸取离心后的上清 120  $\mu\text{L}$  到一个新的 1.5 mL 离心管内，丢弃含细胞沉淀的原有离心管。

**注意：**本步骤为样品检测之前必不可少的步骤，低速离心是为了去除哺乳动物细胞，以排除其对支原体检测的干扰。所以离心力要严格控制在 200 g 左右，该离心力下，哺乳动物细胞将被沉淀下来而支原体不会。如果错误使用更高的离心力将可能导致支原体也被离心下来，可能导致假阴性。而如果错误使用更低的离心力将可能导致哺乳动物细胞不能被离心沉淀下来，从而导致支原体检测时，哺乳动物细胞内的 ATP 也被释放到溶液中，可能导致假阳性。

（2）将含有 120  $\mu\text{L}$  上清的新的 1.5 mL 离心管，在普通台式离心机上 16000 g（大约 13000 rpm）高速离心 5 分钟，沿离心管内壁离心时的内侧面将离心后的上清小心缓慢全部吸走并丢弃（注意：勿让吸头碰到离心管内壁的底部外侧，因为底部外侧可能含有支原体的沉淀！）。往离心管内，加入 120  $\mu\text{L}$  作为阴性对照的培养液（此时，总体积仍然为 120  $\mu\text{L}$ ）。此处不需要用移液枪吹吸均匀。

（3）将上述经过离心清洗一次的样品，再次在普通台式离心机上 16000 g（大约 13000 rpm）高速离心 5 分钟【离心时注意保持离心管放置的方向与上述步骤（2）相同】，同样小心吸走 115  $\mu\text{L}$  离心后的上清并丢弃（注意：同样勿让吸头碰到离心管内壁的底部外侧。留下大约 5  $\mu\text{L}$  培养液的目的也是为了防止吸头碰到离心管底部外侧而将可能含有支原体的沉淀吸走）。往离心管内，加入 115  $\mu\text{L}$  作为阴性对照的培养液（此时，总体积仍然为 120  $\mu\text{L}$ ）。

（4）将上述经过离心清洗两次的样品，用移液枪上下吹吸 10-20 次，将可能含有支原体的沉淀吹打均匀。至此，该样品方可用于后续的支原体检测。

**注意：**（2）-（4）步骤也是样品检测之前必不可少的步骤，高速离心是为了将支原体沉淀下来，而将培养液替换成阴性对照的培养液是为了排除一些细胞代谢产物对后续检测的可能干扰。

5、待测样品的保存 收集并经过低速离心去除细胞和经过高速离心替换成阴性对照培养液的待测样品，如果不是当天立即检测，请放于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，不得放于室温、4  $^{\circ}\text{C}$ 或-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。样品在-80 $^{\circ}\text{C}$ 可以保存至少 2 年。

**注意：**（1）为了日后检测方便，应该同时冻存一些作为阴性对照的培养液。

（2）未经过低速离心去除细胞和未经过高速离心替换成阴性对照培养液的待测样品，不得直接放-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

（3）经我们最新测试表明，经过低速离心去除细胞的样品即可直接放-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，后续高速离心替换成阴性对照培养液的步骤，可以在发光检测时，从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出融化后，统一进行。

6、根据待检测的样品、阴性对照和阳性对照的数量，从-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出相应数量的试剂 A 和试剂 B，放室温 1-5 分钟（注意：不能加热融化），等其融化后立即后放冰上待用。

**注意：**试剂 A 和试剂 B 只能在每次检测之前从-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出的，融解后在室温放置的时间尽可能的短，不能超过 10 分钟。融解后，放冰上的时间也最好不超 1 小时。已经融化后的试剂 A 和试剂 B 不能再次冻存使用。

7、吸取 50  $\mu\text{L}$  阴性对照、阳性对照或者已经经过低速离心去除细胞和经过高速离心替换成阴性对照的培养液的待测样品，放入黑色（优先选择）或者白色不透明的 96 孔板内，加入 50  $\mu\text{L}$  冰上放置的试剂 A，室温反应 15 分钟。注：不能使用透明的 96 孔板，否则孔与孔之间的发光值会互相干扰。

8、室温反应 15 分钟后，加入 50  $\mu\text{L}$  冰上放置的试剂 B，室温反应 3 分钟后，在具有发光检测功能的多功能酶标仪或者单独的发光检测仪（Luminometer）上，以仪器默认的萤火虫荧光素酶（Luciferase）的发光检测参数进行发光值的检测，5 分钟内，连续测 5 次阴性对照和待测样品的发光值，计算各自的平均值。

**注意：**

（1）发光检测（Luminescence）与荧光检测（Fluorescence）、吸收光检测（Absorbance）是不同的功能。吸收光检测即最常用的 OD 值检测。荧光检测（比如常见的 FITC 检测）需要激发光，而发光检测（如荧光素酶的活性检测）不需要激发光。多功能酶标仪常见的检测功能有：吸收光检测、荧光检测和发光检测，三种功能为独立的功能。您如果不清楚您实验室的酶标仪是否具有发光检测功能，请咨询您的实验室主任或者酶标仪厂家。

（2）发光检测时，应该选择不加载任何滤光片（不同酶标仪表达方式不一样，可能是：Unfiltered LUM、All wavelengths 或 Open hole）进行检测【此时读值较高】或者使用萤火虫荧光素酶（Luciferase）最强的发光波长 560 nm 进行检测【此时读值较低】；

（3）可以通过调节酶标仪的检测灵敏度（Sensitivity）或延长发光检测的时间（Integration time, Measurement time），尽量让

阴性对照的发光值大于 1000;

(4) 如果样品是无血清细胞培养上清, 相应的阴性对照培养基因不含血清, 其发光值可能会比较低, 甚至只有 100 左右的发光值, 此时可以在阴性对照培养基中加入 10% 的胎牛血清或小牛血清, 当然无血清细胞上清样品也必须用含 10% 的胎牛血清或小牛血清的阴性对照培养基进行替换 (高速离心后替换, 见上述步骤 4) 后, 再进行检测。加入血清后一般可以明显提高阴性对照的发光值。

## 【结果判断】

计算待测样品的发光平均值与阴性对照的发光平均值的比值:

- 1、如果比值 $>1.2$ , 说明待测样品有支原体污染 (阳性)。绝大部分阳性样品, 该比值都在 1.5 以上。严重的污染, 该比值甚至可以达到 10 以上。
- 2、如果比值在 1.1-1.2 之间, 说明待测样品可疑有支原体污染 (可疑阳性)。但该样品需要继续培养 24-48 小时后, 重新检测。如果继续培养 24-48 小时后, 重新检测的比值仍然在 1.1-1.2 之间, 应该判为阴性。
- 3、如果比值 $<1.1$ , 说明待测样品无支原体污染 (阴性)。

### 注意:

(1) 以上比值只是一个经验值, 如果同一个样品的 5 次发光值读数之间的差异小于 10%, 上述比值与污染之间的对应关系一般是正确的。如果同一个样品的 5 次发光值读数之间的差异大于 10%, 上述比值与污染之间的对应关系就未必正确。这时, 比值接近检测下限的样品, 就需要根据具体情况来确定是阴性还是阳性。

(2) 新的实验室初期建立该方法时, 应该同时使用不同原理的支原体检测试剂盒进行相互确认 (我们推荐使用含内参对照的 PCR 法支原体检测试剂盒, 比如我们公司的 PM008)。

## 【注意事项】

- 1、本试剂盒只在 96 孔板进行过测试。因为发光值会随时间略有变化, 如果使用单管的发光检测仪, 尽量保证 阴性对照和待测样品加入试剂 A 后的反应时间和加入试剂 B 后到发光值检测的反应时间相同。
- 2、本试剂盒灵敏度与 30 cycles 的 PCR 基本相当。
- 3、问: 如果配制完后放于 4°C 冰箱未用于细胞培养且成分完全相同的培养液本身有支原体污染 (比如加入的血清本身含支原体), 是否仍然可以用作阴性对照?  
答: 可以。因为: 即使作为阴性对照的培养液本身有支原体污染, 其中的含量也是极其微量的。而待测样品是经过培养 3 天以上的, 其支原体在这 3 天培养过程中, 会大量繁殖, 用《发光法支原体检测试剂盒》检测的发光值, 肯定比阴性对照的发光值高得多。
- 4、本试剂盒与 Lonza 公司的 MycoAlert Plus Mycoplasma Detection Kit 的原理一样, 可以替代后者用于细胞培养上清的支原体检测。
- 5、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和预防试剂。

## 【附录: 如何检测血清是否含有支原体污染?】

一、血清有没有支原体污染这是细胞培养用户非常关心的问题。其检测方法有相当的特殊性, 现介绍如下:

1. 必须认识到血清不适合直接检测, 在对其进行检测之前, 必须将其中可能含有的支原体进行大量的繁殖。这是因为: (1) 商品化的血清都是经过 0.1  $\mu\text{m}$  的滤膜多次过滤的而且长期低温保存和运输, 其中即使含有支原体, 其含量也必然是极其微量的 (比如 1 mL 就含有几个支原体), 直接检测一般是检测不出来的; (2) 如果不对其进行大量繁殖而直接用《一步法恒温支原体检测试剂盒》进行检测, 由于该试剂盒灵敏度非常高, 很多血清的检测结果会介于阳性和阴性之间。但是这也只能说明其含有微量的支原体 DNA, 不能说明其含有活的支原体。当然, 如果检测结果与阳性对照完全一样, 呈典型的蓝绿色, 说明其支原体 DNA 的含量确实较高, 也间接说明其血清质量较差, 在其生产过程中, 没有控制好支原体的污染。如果检测结果与阴性对照完全一样, 呈典型的紫红色, 也间接说明其血清质量较高。但是以上几种结果都不能直接说明该血清一定含有活的支原体或者一定不含有活的支原体。(3) 血清往往含有抑制 PCR 扩增的成分, 直接用 PCR 法进行检测也是无法准确判断的。
2. 血清样品中支原体的繁殖方法: 分别取 1 mL 的血清, 按 1:10 稀释到 2 种不同的支原体液体培养基 (其中一种不含精氨酸, 另外一种含精氨酸) 中【注意: (1) 因为每种支原体的营养需求不一样, 2 种支原体液体培养基都必须同时接种和培养; (2) 血

清接种的量不能太小，一般接种不少于 1 mL，否则可能漏检；(3) 不能使用常规的哺乳动物细胞培养液代替支原体液体培养基。因为经我们测试：在没有动物细胞共培养的情况下，支原体在含 10% 血清的动物细胞培养液如 DMEM、1640、MEM、GMEM 中繁殖非常缓慢，甚至完全不繁殖。】，然后部分放 4 °C 冰箱，部分放 37 °C 二氧化碳培养箱或者普通的细菌培养箱中培养 3-7 天【对于生长速度快的支原体，3 天的培养已经足够；对于生长速度慢的支原体，培养的时间可以适当延长】。3-7 天后，进行支原体的检测【建议培养 3 天和 7 天后各检测一次】。

3. 培养 3-7 天后的样品中支原体的检测方法，可以在本公司《发光法支原体检测试剂盒》、《一步法恒温支原体检测试剂盒》和《PCR 法支原体检测试剂盒》中任选 1-3 种进行检测。由于，血清是否含有支原体，事关重大，我们建议至少使用两种方法进行检测。
4. 如果条件许可，我们建议其中一种方法尽量选择《发光法支原体检测试剂盒》，因为该方法可以区分支原体的死活，而且可以进行定量的分析，可以知道：培养 3 天或 7 天后，支原体繁殖了多少倍。使用该方法，具体操作如下：以放 4 °C 冰箱的含 10% 待测血清的支原体液体培养基作为阴性对照，用《发光法支原体检测试剂盒》检测培养箱中培养 3 天的培养液，其发光值是否明显增高，从而判断最初加入的血清是否含支原体。
5. 当然，培养 3-7 天后的样品，也可以用《一步法恒温支原体检测试剂盒》和《PCR 法支原体检测试剂盒》进行检测。用这两种方法进行检测时，建议同时检测原液、1:10 和 1:100 的稀释液，稀释液用 PBS。这是因为：(1) 原液仍然含有 10% 的血清，其仍然有可能抑制 PCR 的扩增；(2) 一个样品同时检测三个稀释度，对于结果判断的准确性非常有帮助。结果判断如下：(1) 如果三个稀释度的检测结果都为阴性，说明血清没有支原体污染；(2) 三个稀释度的检测结果只要一个为阳性，说明血清有支原体污染，而且极有可能是污染了活支原体。最常见的结果是三个稀释度都为阳性或三个稀释度都为阴性。
6. 本公司同时提供 2 种支原体液体培养基（干粉型）产品，其中一种不含精氨酸，另外一种含精氨酸。大家购买后，自己按说明书配成支原体液体培养基，其中的马血清可以不加，而用待测的胎牛血清代替（终浓度 10% 即可）。其中的青霉素可以不用添加或者用细胞培养用的青霉素和链霉素（100×，按 1:100 加入）代替。1 瓶支原体液体培养基（干粉型）大约可以检测 1000 个血清样品。
7. 如果大家觉得上述检测非常繁琐，本公司同时供应经上述步骤严格检测，证明 100% 不含活支原体的精选进口胎牛血清。

## 二、如何检测胰酶、抗生素、未使用的动物细胞培养液等细胞培养相关试剂是否含有支原体污染？

这些样品也不适合直接检测。方法与血清的检测方法非常类似，在对其进行检测之前，也必须将其中可能含有的支原体进行大量的繁殖。首选，必须先检测支原体液体培养基中含有的血清是否被支原体污染，在保证血清没有支原体污染的前提下，配制含 10% 经证明没有支原体污染的血清的支原体液体培养基，然后将不少于 1 mL 的胰酶、抗生素或者动物细胞培养液等按 1:10 稀释到该培养基中，然后部分放 4 °C 冰箱，部分放 37 °C 二氧化碳培养箱或者普通的细菌培养箱中培养 3-7 天，3-7 天后的进行支原体的检测，方法同上。

### 【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。