细胞培养专用《一步法恒温支原体检测试剂盒》（溶液型）使用说明书（版本 20250827）

【提醒：生产日期在 20211201 之后的产品，必须使用本版说明书！】

货号

MD001

包装规格

50 次/盒

储存条件

该产品随冰袋运输，收到产品后请立即放-20 ℃（预计产品在 6 个月内使用完毕）或-80 ℃（超过 6 个月）冰箱冷冻保存。产品一旦从-80 ℃取出后，请放-20 ℃保存，不得继续放回-80 ℃。该条件下，至少 3 年内仍然有活性。

产品用途

《一步恒温法支原体检测试剂盒》（One-step Quickcolor Mycoplasma Detection Kit）主要用于检测细胞培养液或别的液体样品中是否含有支原体。本产品仅供科研使用。

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）。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。

培养法和荧光染色法虽然是我国药典收录的支原体检测方法，但是因为其各自都有明显的缺点，不适合作为支原体快速检测的方法。

本公司目前已经开发出四种不同原理的快速支原体检测试剂盒，分别是：《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》、《发光法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》，其各自都有自己的优缺点（详情请参考本公司网站）。

《一步法恒温支原体检测试剂盒》使用独特的恒温基因扩增技术，有明显的优点：（1）整个检测过程只需 1 小时，大大缩短了检测时间；（2）未发现细胞培养液中的 PCR 抑制剂会抑制恒温基因扩增，所以一般无需进行样品的前处理；（3）恒温基因扩增的灵敏度良好，一般比 30 个循环普通 PCR 法高；（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、凝胶成像仪等仪器，整个检测过程只需一个水浴锅。

《一步恒温法支原体检测试剂盒》主要缺点：（1）支原体识别率相对较低，大约只能识别污染细胞所有支原体种类的 99%左右，还有大约 1%的支原体可能无法识别，从而导致假阴性；（2）高浓度的血清和相关血液制品、二价离子和 EDTA 等可能会对显色结果产生干扰（注：可以通过离心清洗去除干扰），导致结果误判。

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）*A. laidlawii*、（9）*M. agalactiae*、（10）*M. bovis*、（11）*M. buccale*、（12）*M. arthritidis*、（13）*M. pulmonis*（注：*M.*为 *Mycoplasma* 的缩写；*A.* 为 *Acholeplasma* 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：目前文献报道，体外细胞支原体污染的种类大概有 19-20 种，具体支原体种类请看本公司《PCR 法支原体检测试剂盒》说明书）。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）！

《一步法恒温支原体检测试剂盒》的检测灵敏度：经测试，在每个反应管的 DNA 加入量为 2 μL 的情况下，《一步恒温法支原体检测试剂盒》的最高检测灵敏度（即检测下限）大约在 20-400 个 copies，即 10-200 copies/μL。可以通过离心浓缩、提取支原体基因组 DNA 等措施，其检测灵敏度可以在此基础上继续提高 10-100 倍。

由于任何一种快速支原体检测方法都无法保证检测结果 100%正确，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》、《发光法支原体检测试剂盒》和《探针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。如果几种不同支原体检测方法的检测结果一致，正确率几乎就是 100%。

试剂盒组成

（1）溶液 1：1075 μL （50 次检测）；
（2）溶液 2：55 μL；
（3）溶液 3：指示剂，38 μL；
（4）阳性支原体 DNA：50 μL。

- 需要自己准备的耗材和试剂：（1）0.2 mL 透明度良好的平盖 PCR 管；（2）200 μL 和 10 μL 滤芯吸头（比如 Axygen 公司）；以上两种耗材可以在淘宝网购买。（3）矿物油：由于大部分客户都使用 PCR 仪进行反应，无需使用矿物油。使用水浴锅进行反应的客户，需自己另外购买矿物油【推荐：从上海生工生物公司购买，货号：B500301-0100，每瓶 100 mL 约需 50 元，每个试剂盒大约需要 1.5 mL；或者从本公司购买（1.5 mL/支，货号：MO101），10 元/支】。

检测过程

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需要取自换液后培养 2-3 天且汇合度在 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，让细胞生长 2-3 天再取培养液进行检测。可以按照以下两种方法之一进行样品的前处理：

方法一：直接检测（该方法检测灵敏度不如方法二，也无法去除可能的干扰物，显色被干扰的可能性较大）：

（1）取 150 μL 上述待测样品到 1.5 mL 离心管内，在普通台式离心机上 1000 rpm (大约 150 g)低速离心 5 minutes，取离心后的上清 100 μL 用于支原体检测，丢弃下层剩余的 50 μL（含细胞沉淀）。

（2）已经离心去除细胞的待测样品可以直接检测，也可以进行热处理后再检测（热处理后，样品保存更稳定），具体如下：95 ℃加热处理 5 minutes（可以转移到 PCR 管内，在 PCR 仪上进行加热处理），简单离心（1000 g，5 seconds）后，取上清进行检测。

方法二：简单离心清洗（推荐方法。该方法不仅可以浓缩支原体从而提高检测的相对灵敏度，还可以去除绝大部分可能的干扰物，显色被干扰的可能性极小。如果该简单一步离心清洗的方法仍然无法去除干扰物，可以使用后文注意事项部分的三步离心清洗的方法。）：

（1）根据浓缩倍数，可以取 100 - 1500 μL 上述待测样品到 1.5 mL 离心管内，在普通台式离心机上 1000 rpm (大约 150 g)低速离心 5 minutes，将离心后的上清转移到另一个离心管内，丢弃细胞沉淀。

（2）将上清继续 13000 rpm（约 16000 g）高速离心 5 minutes，小心吸走全部上清（为避免碰到底部沉淀，可以保留底部 3-5 μL 液体），用 20-50 μL 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8（样品可以长期保存。推荐）或者去离子水（样品比较不稳定，只适合当天或短期内检测使用）重悬沉淀（沉淀中含有支原体），吹吸均匀【如果最初使用了 1500 μL 的样品而最后用 20 μL 重悬，则支原体浓度大约提高了 75 倍，相对灵敏度也提高了 75 倍】。

（3）该重悬后的样品可以直接检测，也可以进行热处理后再检测（热处理后，样品保存更稳定）。热处理具体如下：95 ℃加热处理 5 minutes（可以转移到 PCR 管内，在 PCR 仪上进行加热处理），简单离心（1000 g，5 seconds）后，取上清进行检测。

- 注 1：这里的细胞培养上清不是指细胞经胰酶消化后的离心上清，而是指至少培养 2 天后的贴壁细胞培养液上清（不需要胰酶消化，也不能取经胰酶消化后的离心上清进行检测）或悬浮细胞培养液。
- 注 2：本步骤的低速离心是为了去除哺乳动物细胞，以排除其不必要的干扰。所以离心力要严格控制在 150-200 g，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，从而导致假阴性。
- 注 3：收集的待测细胞培养液样品如果不立即检测，请放于-20℃或-80℃冰箱保存，不得放于室温或 4℃冰箱。样品在-20℃至少可以保存一个月，在-80℃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℃或-80℃冰箱保存，而后一起检测。
- 注 4：如果预期待测样品支原体含量较少（比如，低温保存的血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液、生物制品、极个别细胞培养上清等），可以采取措施以提高检测的灵敏度，具体方法请看后文注意事项部分：如果提高本试剂盒检测灵敏度。

2. 反应体系的配制【本步骤所有操作强烈建议使用进口滤芯吸头（比如 Axygen 滤芯吸头）进行操作，以避免试剂被污染。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 ℃冰箱中取出，室温融化后，请进行以下处理后再使用。

- 溶液 1：最近在测试时，发现处于分装末尾的个别溶液 1 管内会有絮状的不溶物出现（可能是个别试剂的纯度不够导致的），该不溶物必须去除，否则会对反应结果的颜色有干扰。去除方法如下：将融化后的溶液 1 上下颠倒混匀几次后，放台式离心机内，8000 g 离心 5 min，将离心后的上清转移到一个新的离心管内，吹吸均匀后使用（转移上清时，请保留底部 5-10 μL 的溶液，尽量不要碰到底部的沉淀），丢弃含沉淀的原离心管。注意：（1）不管溶液 1 中是否有不溶物，需对所有试剂盒内的溶液 1 统一做上述的离心处理后再使用；（2）随货如果配有一个空的 1.5 mL 离心管，可以直接使用；如果没有，请自己准备一个空的 1.5 mL 离心管。
- 溶液 2 必须一直在-20 ℃冰箱中保存【溶液 2 在-20 ℃不会冻住】，不能放于室温。
- 溶液 2 和溶液 3 每次开盖之前，请离心一下。
- 溶液 3 必须离心（大约 3000 rpm，离心 1 分钟）一下，吹吸均匀后再使用。注：溶液 1 和溶液 3 每次融化后都必须吹吸均匀后再吸取
- 溶液 3 为指示剂，其使用量一般是每个反应处于 0.4-0.8 μL 之间，最佳使用量请根据试剂盒中溶液 3 离心管上标签的标注为准（注意：不同批次溶液 3 的最佳使用量可能不同！）。

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（μL）	样品总数	总体积（μL）
溶液 1	21.5	N	21.5×N×1.06
溶液 2	1	N	1×N×1.06
溶液 3	0.4-0.8	N	（0.4-0.8）×N×1.06

- 举例：1）如果待测样品为 8 个（加上 1 个阴性和 1 个阳性对照），则样品总数为 10 个。溶液 1 的总体积为 21.5×10×1.06=227.90 μL。溶液 2 的总体积为 1×10×1.06=10.60 μL。由于溶液 3 的最佳使用量需根据试剂盒中溶液 3 离心管上标签的标注为准，假设标注的最佳使用量是 0.5 μL/反应：则溶液 3 的总体积为 0.5×10×1.06=5.3 μL。将溶液 1、溶液 2 和溶液 3 混合均匀即可。2）如果打算一个试剂盒一次使用完毕，可以按照以下方法进行配制：直接往整管溶液 1（1075 μL）中加入 50 μL 溶液 2 和 25 μL

溶液 3（假设标注的最佳使用量是 0.5 μL/反应），混合均匀即可。如果一次使用完毕，一个试剂盒大概可以检测 48-49 个样品。

- 注：1）溶液 3 为指示剂，其对温度和光敏感，溶液 3 经反复冻融或长久光照后，其指示的效果可能变差。如果发现：反应后阳性对照的颜色偏浅（正常应该是深蓝色或蓝绿色）并且与阴性对照的颜色区别不显著，当以上两个条件同时满足，再次做实验时，指示剂可以稍微多加一点，每个反应的使用量可以在原有基础上增加 20%。假设标注的最佳使用量是 0.5 μL/反应，则可以从 0.5 μL 增加到 0.60 μL，后续根据调整后的反应结果再适当增减；2）总体积中多配制 6%（客户如果觉得该比例不合适，可以自己调整），是为了防止移液误差，以保证每个反应管中的反应液足量；3）溶液 1 和溶液 3 使用完后，请继续放回-20 ℃冰箱中保存。

（2）将上述配制好的恒温反应体系，吹打均匀后，按每管 23 μL 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。如果分装时最后一管反应液不足，可以将其作为阴性对照管；2）PCR 管应该使用透明度良好的 PCR 管。

（3）阴性对照管（Negative）可以加入 2 μL 灭菌水（自备，也可以不加）；往测试管（Test）中加入 2 μL 待测样品；往阳性对照管（Positive）中加入 2 μL 阳性支原体 DNA。反应液的总体积为 25 μL。

- 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。吸取之前，请吹吸均匀后再吸取。如果不小心高速离心了，务必吹吸均匀后再吸取，否则阳性对照结果可能异常。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）：

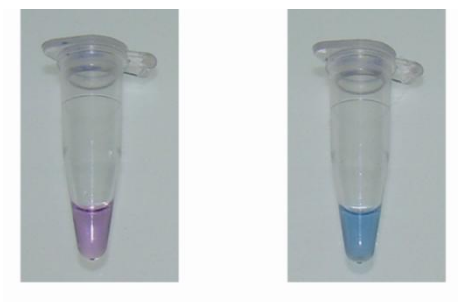
（1）水浴内反应（注意：本产品只能使用含水的普通水浴锅，不能在没有水的纯金属浴内反应，因为没有水的纯金属浴温度非常不准确。）：往每个反应管内加入 25 μL 矿物油，以防止水份挥发，盖上盖子，将反应管插入带孔的漂板内，放入已经升温到 61℃的普通水浴内，准确反应 60 分钟。

- 注：在反应之前，水浴锅必须先升温到 61℃，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℃。

（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 ℃，60 min；10 ℃, forever；热盖温度，105 ℃。

- 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（现在的 PCR 仪基本都是带热盖的）。

4. 结果判断：61℃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。如果样品溶液为蓝绿色，则说明有支原体污染；如果样品溶液为紫红色，则说明没有支原体污染（如图 1）。具体判断方法：首先，看看反应后阳性对照和阴性对照的颜色是否有显著区别（反应后阳性对照正常应该是深蓝色或蓝绿色，阴性对照应该是浅红色或紫红色，见图 1），只要反应后阳性对照与阴性对照的颜色有显著区别，则说明反应成功。其次，反应后样品的颜色只要与阳性对照有显著区别，就应该判为阴性。



Negative reaction Positive reaction

图 1. 左边为阴性反应结果，右边为阳性反应结果。

- 注 1：在 61℃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℃反应 60 分钟后，阳性和阴性颜色区别不明显，可以考虑将已经反应 60 分钟的反应管，继续在 61℃的水浴或 PCR 仪上反应 10 分钟。但是如果 61℃反应 60 分钟后，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（正常这种情况应该概率很低，如果经常出现，样品中可能含有可干扰正常指示效果的物质，必须先去除。去除方法见后文注意事项部分），可以将这些样品继续 61℃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。这种可疑样品建议用相同试剂盒或者不同原理的其他试剂盒（如本公司的《PCR 法支原体检测试剂盒》、《发光法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》）进行复检。
- 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。
- 注 4：不同批次的产品以及由于拍照等原因，反应后阳性对照和阴性对照的颜色可能会与本说明书图 1 的颜色略有差异。只要反应后阳性对照与阴性对照的颜色有显著区别，就说明反应成功。

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 无血清培养基和一些血液制品（比如：白蛋白溶液、血浆原液、血清原液等）上发生过。常见的 DMEM、MEM、F12、1640 等培养基（可以含 10%血清）一般不会发生该现象。去除方法：（1）离心清洗：取 1 mL 细胞上清或待测样品（比如：白蛋白溶液、血浆原液、血清原液），先 13000 rpm（约 16000 g）离心 5 min，吸走 950 µL 上清；加 PBS（必须不含钙离子和镁离子）950 µL，再次离心，吸走 950 µL 上清；再加 PBS 950 µL，第三次离心，小心吸走全部上清（为避免碰到底部沉淀，可以保留底部 3-5 µL 液体），用 20-50 µL 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8（样品可以长期保存。推荐）或者去离子水（样品比较不稳定，只适合当天或短期内检测使用）重悬沉淀，吹吸均匀。该重悬后的样品可以直接检测，也可以进行热处理后再检测（热处理后，样品保存更稳定）。热处理具体如下：95 ℃加热处理 5 minutes（可以转移到 PCR 管内，在 PCR 仪上进行加热处理），简单离心（1000 g，5 seconds）后，取上清进行检测。由于离心清洗可能导致支原体部分丢失，如果样品支原体含量很低，可能导致漏检。（2）使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》提取支原体 DNA 后进行检测。通过 DNA 提取，即可以将所有可能的干扰物质全部去除，又可以将支原体 DNA 浓缩 10-100 倍。
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。如果打算用试剂盒提取支原体 DNA（推荐使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》），请用去离子水或者不含 EDTA 的 5 mM Tris.HCl（pH 8.0-8.8）的缓冲液洗脱和溶解 DNA。
3. **防 DNA 污染注意事项：**

   （1）恒温反应体系配制的房间（本试剂盒请在有窗户、通风良好的普通房间操作。请勿在密闭的细胞培养间进行该步骤的操作，因为细胞培养间支原体污染概率很高），与用于样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间一定要分开。

   （2）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。

   （3）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）。移液枪中吸附的支原体有可能造成不必要的假阳性。

（4）样品前处理的各类吸头、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。

（5）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。

（6）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。

4. **本试剂盒的检测准确率**：（1）由于本试剂盒能识别的支原体大概只占了污染细胞的支原体的 99%左右，还有 1%左右的污染细胞的支原体有可能不认识，这可能会导致 1%左右的假阴性（漏检）。（2）由于人体的口腔、皮肤和尿道都是含有支原体的，而且常用的肿瘤细胞系支原体污染率非常高，一般在 15-90%之间，导致实验室环境甚至移液枪也经常含有支原体，这可能导致出现极个别的假阳性（多检，正常这种概率应该低于 1%）。总体来说，单独使用本试剂盒有可能出现 1-2%左右的错误率（注意：细胞培养中支原体出现的概率是来自文献数据，是大量体外细胞培养支原体污染调查的结果。如果你们实验室细胞污染的恰巧是出现概率比较低而本试剂盒又不认识的支原体，漏检的概率会大幅度上升。因此：对所有重要的样品（比如，可能用于人体的细胞），不能只依靠本试剂盒就下最终检测结论，必须至少同时使用另外一种支原体识别率为 100%的支原体检测试剂盒【比如本公司《PCR 法支原体检测试剂盒》或《探针法支原体检测试剂盒》】进行检测，互相验证！）。为了提高检测的准确率，建议客户采取以下两种措施：第一，对所有本试剂盒检测出的阳性样品，利用本试剂盒或者其他不同原理的支原体检测试剂盒进行复检（复检可以基本排除因环境污染导致的假阳性），或者检测时所有样品直接使用两个反应管同时检测检测，只有同一个样品两个反应管的检测结果都为阳性时，才能判断为真正的阳性样品。第二，对所有重要的样品（比如，可能用于人体的细胞），必须至少同时使用两种（甚至三种）不同原理的支原体检测试剂盒（其中一种方法推荐使用支原体识别率为 100%的《PCR 法支原体检测试剂盒》或《探针法支原体检测试剂盒》）进行检测，互相验证。

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，以及水浴专用杀菌剂和环境专用杀菌剂。

6. 支原体检测样品可以分成两类：第一类，用含血清的培养液培养的哺乳动物细胞上清液，由于该条件非常适合支原体生长，培养数天后，支原体密度一般较高，可达 10^{7-9}/mL，可以直接检测。第二类，低温保存的血浆、血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液等样品，由于这些样品即使有支原体污染，支原体含量一般很少，直接使用快速支原体检测试剂盒进行检测，往往检测不出来。这些样品建议：（1）对样品的支原体进行离心浓缩或者使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》将支原体 DNA 浓缩提取，该两种方法大约可以将检测灵敏度继续提高 10-100 倍。该方法速度快，当天出结果，但是可靠性不如后面的培养法。（2）使用支原体液体培养基（必须同时接种不含精氨酸和含精氨酸的两种支原体液体培养基）培养 3-7 天后，再进行检测。具体方法请参考本公司《发光法支原体检测试剂盒》说明书中最后的注意事项部分。该方法速度较慢，需要 3-7 天，但是可靠性高。

7. **如何提高本试剂盒检测灵敏度**：如果预期待测样品支原体含量较少（比如，低温保存的血清、脐带血、胰酶、抗生素、未使用的培养液、生物制品、极个别细胞培养上清等），可以采取以下几种措施：（1）通过使用本公司《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》，将支原体 DNA 浓缩提取后再进行检测（提取过程可以把 PCR 抑制剂尽可能去除），大约可以将检测灵敏度提高 10-100 倍。（2）对支原体进行离心浓缩：取 1 mL 细胞上清，先 13000 rpm（约 16000 g）离心 5 minutes，吸走全部上清，用 50 µL 5 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.8 重悬沉淀，95 ℃加热处理 5 minutes，简单离心后（1000 g，5 seconds），取上清进行检测。该离心浓缩过程大约可以将检测灵敏度提高 20 倍（细胞上清的初始体积越大，灵敏度提高的倍数也越大）。