

《发光法支原体检测试剂盒》说明书 (版本 20210205)

【本说明书会不定期更新, 每次收到新的产品时, 请到本公司网站重新下载最新版本!】

货号

LM009

包装规格

50 次/盒

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 50 μL 分装到 1.5 mL 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!

产品用途

《发光法支原体检测试剂盒》(Luminescence Mycoplasma Detection Kit) 可用于检测体外培养的哺乳动物细胞或者其他样品是否被支原体污染。

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)。

《发光法支原体检测试剂盒》具有检测时间短、支原体识别率高、可以检测活的支原体、不存在因反应被抑制导致的假阴性、不存在污染导致的假阳性等优点。

《发光法支原体检测试剂盒》主要缺点: 支原体必须经过繁殖后才能检测。

《发光法支原体检测试剂盒》检测灵敏度: 经测试, 在每个反应孔的活菌加入量为 50μL 的情况下, 《发光法支原体检测试剂盒》的检测下限 (即需要样品的发光值与阴性对照的发光值的比值大于 1.2) 大约为 2200 个活菌/μL。可以通过离心浓缩, 其检测灵敏度可以在此基础上继续提高至少 10 倍。

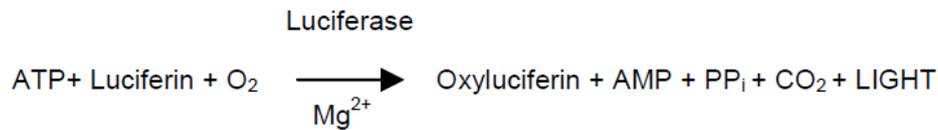
此外, 作为支原体检测领域的共识, 单独使用任何一种支原体检测方法, 都无法做到 100% 正确, 既不会漏检 (假阴性), 也不会多检 (假阳性)。严格的支原体检测, 至少需要使用两种 (最好使用三种) 不同原理的支原体检测方法同时进行检测, 才能使检测结果接近 100% 正确。

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%。

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

《发光法支原体检测试剂盒》具有如下显著的优点:

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》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《探针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》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《探针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: 由于本试剂盒依赖的支原体特异性酶普遍存在, 其具有广谱的识别能力。

试剂盒组成

- (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, 发光法阳性对照需要单独购买 (货号: LPC10)。

检测过程

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 μ L 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作为阴性对照。如果有些样品实在没有合适的阴性对照或者不知道样品原来的培养基组成, 可以尝试使用含 10% 血清的 DMEM 培养基作为阴性对照。

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》和《探针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)。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 2-3 天且汇合度在 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 2-3 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) 根据浓缩倍数, 可以取 180-1500 μ L 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 (注意: 转移离心上清时, 请保留底部 60 μ L 左右的液体, 以防止将底部细胞沉淀吸走!), 丢弃含细胞沉淀的原有离心管。

- 注意 1: 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 150 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。

- 注意 2: 如果初始体积是 1500 μ L, 大约可以将支原体浓度提高 10 倍, 从而提高检测的相对灵敏度 10 倍 (如有必要, 可以继续增加样品的初始体积, 从而进一步提高检测相对灵敏度)。

(2) 将含有上清的新的 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 μ L 作为阴性对照的培养液。

(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 μ 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 μ L 培养液的目的是为了以防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 μ L 作为阴性对照的培养液 (此时, 总体积仍然为 120 μ 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 (够两次检测使用)。

- 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, 最好当天检测完毕。如果不是当天立即检测, 请放于-80℃冰箱保存, 不得放于室温、4℃或-20℃冰箱。样品在-80℃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℃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℃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℃冰箱取出融化后统一进行。

6. 在制备好上述待测样品、阴性对照和阳性对照后, 根据待检测的样品、阴性对照和阳性对照的数量, 从-80℃冰箱取出相应数量的试剂 A 和试剂 B, 放冰上, 待其融化后使用 (注意: 不能加热融化)。

- 注意: 试剂 A 和试剂 B 只能在每次检测之前从-80℃冰箱取出的, 只能在冰上融化。融化后, 放冰上的时间不得超过1小时【注意: 融化后的试剂 A 和试剂 B 最好立即使用, 融化后冰上放置的时间越长, 发光读值可能就越低】。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 μL 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 μL 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 μL 冰上放置的试剂 B, 无需等待, 立即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。
- 注意 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】;
- 注意 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;
- 注意 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。

- 注意 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) 或者我们公司的《探针法支原体检测试剂盒》】。

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、问: 如果配制完后放于 4℃ 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。
- 3、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。
- 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和预防试剂, 以及水浴专用杀菌剂和环境专用杀菌剂。

附录: 如何检测血清是否含有支原体污染?

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: 商品化的血清都是经过 0.1 μm 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。【该类样品折中的方法是: 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, 但是可靠性不如培养法。】
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℃ 冰箱, 部分放 37℃ 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《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, 我们建议至少同时使用两种 (最好使用三种) 方法进行检测 (其中一种我们推荐使用含内参对照的《PCR 法支原体检测试剂盒》或者选择《探针法支原体检测试剂盒》, 因为只有这两种试剂盒支原体识别率达到 100%)。
4. 如果选择《发光法支原体检测试剂盒》进行检测, 具体操作如下: 以放 4℃ 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》、《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。用这即种方法进行检测时, 建议同时检测原液和 1:10 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) 一个样品同时检测两

- 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) 如果两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) 两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。最常见的结果是两个稀释度都为阳性或两个稀释度都为阴性。
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 \times , 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。

其他: 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 部分放 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。