

《支原体清除和预防试剂》使用说明书（版本 20201215）

货号

MR002	支原体清除试剂 1
MR003	支原体清除试剂 2

运输和储存

该产品在常温下运输，收到产品后请放于-20℃保存，该条件下，至少可以保存2年。

产品用途

该产品专用于杀灭和清除哺乳动物细胞培养液中污染的支原体。该产品仅用于基础研究，非临床用品。

试剂盒组成

支原体清除试剂 1	1.0 mL (清除：按 1:1000 加入；预防：按 1:5000 加入)
支原体清除试剂 2	1.0 mL (清除：按 1:1000 加入；预防：按 1:5000 加入)

支原体简介

支原体 (Mycoplasma) 是一种没有细胞壁的原核生物，大小约 0.3 - 0.8 微米。目前，已发现的支原体品种有 100 多种。由于支原体直径较小，经常可以穿过实验室常规的 0.20 微米孔径的除菌滤膜，高压过滤时，甚至可以穿过 0.10 微米孔径的除菌滤膜，造成细胞的支原体污染。

细胞培养的支原体污染来源主要有：（1）细胞之间的交叉污染，这是支原体污染的最主要原因；（2）细胞培养操作人员的口腔、皮肤等。（3）细胞培养用的组分，如血清、培养液等；

哺乳动物细胞的培养，支原体污染是个世界性的问题。目前，世界各国细胞系支原体污染的平均比例为 30-60%，有些国家甚至高达 80-90%。

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，以保证所用的细胞没有支原体污染。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。

由于支原体体积比细菌小很多，通常支原体污染密度非常的高，可达 10^{7-9} /mL 培养液，但即使这么高密度的支原体污染也无法通过普通显微镜的肉眼观察进行判断。而且，轻度到中度的支原体污染通常不会导致细胞形态或生长速度的明显改变，也不会明显改变培养液的浑浊度或培养液的 pH 值。

以上两个原因就导致体外培养的细胞即使被支原体污染了，一般的科研工作者也不会觉察到。也就是说：如果不进行支原体的常规检测，你甚至不知道你培养的细胞被支原体污染了，而污染的支原体却在悄悄改变你的实验数据和实验结果，你却被蒙在鼓里！

发现培养的细胞被支原体污染，将污染的细胞高压蒸汽灭菌，然后丢弃是最好的选择，这样可以避免细胞的交叉污染。但是如果细胞比较珍贵，可以考虑用支原体清除试剂进行杀灭和清除。

产品简介

本公司开发的支原体清除试剂 1 含有抑制支原体蛋白质合成的药物，而支原体清除试剂 2 含有抑制支原体 DNA 合成的药物。由于两种试剂的作用机理不同，支原体清除试剂 1 需要处理不少于 15 天，而支原体清除试剂 2 只需处理 7 天。两者都可以达到永久杀灭和清除支原体的目的。

大约 5-10% 的支原体会对清除试剂 1 或清除试剂 2 产生抗性，此外，也有 3-5% 左右的细胞会在杀灭支原体的过程中死亡，由于上述两个原因，我们一般建议同时购买两种支原体清除试剂。如果发现细胞被污染，可以将细胞分成三份：第一份添加清除试剂 1，第二份添加清除试剂 2，第三份同时添加清除试剂 1 和清除试剂 2 进行杀灭，这样支原体对两种药物同时产生抗性和处理过程中细胞同时死亡的概率会非常低。

使用方法

（一）支原体清除试剂 1

1. 使用之前，先将支原体清除试剂 1 用 PBS 或者无血清培养液稀释 10 倍后，放 4℃ 冰箱保存。
2. 将 50-100 万个细胞铺到 60 mm 的细胞培养皿内，加入 4 mL 含支原体清除试剂 1 的正常细胞培养液（使用稀释 10 倍后的支原体清除试剂 1，按 1:100 比例加入）。
3. 每 2-3 天更换细胞培养液。换液时，用 PBS 冲洗 2-3 遍细胞，以将死亡的支原体清洗干净。而后加入新鲜

的含支原体清除试剂 1 的正常细胞培养液。期间如果细胞密度过大，请保持细胞密度适当（贴壁细胞可能需要胰酶消化），并更换新的培养皿。

4. 处理 15 天后，可以用支原体检测试剂盒进行检测，检测支原体是否杀灭完全。如果仍有支原体残留，可以考虑再处理 6 天。
5. 以后每隔 1 个月进行支原体的常规检测，以保证没有新的支原体污染。

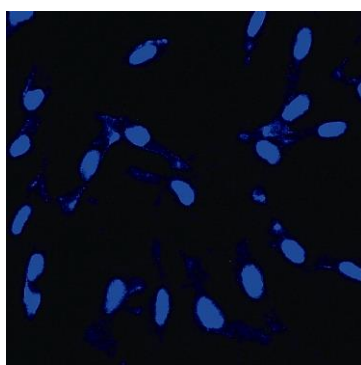
（二）支原体清除试剂 2

1. 使用之前，先将支原体清除试剂 2（注意：支原体清除试剂 2 在 -20°C 保存后，解冻时可能会有细小的结晶析出）用 PBS 或者无血清培养液稀释 10 倍后（此时，支原体清除试剂 2 应该彻底溶解），放 4°C 冰箱保存。
2. 将 50-100 万个细胞铺到 60 mm 的细胞培养皿内，加入 4 mL 含支原体清除试剂 2 的正常细胞培养液（使用稀释 10 倍后的支原体清除试剂 2，按 1:100 比例加入）。
3. 每 1-2 天更换细胞培养液。换液时，用 PBS 冲洗 2-3 遍细胞，以将死亡的支原体清洗干净。而后加入新鲜的含支原体清除试剂 2 的正常细胞培养液。期间如果细胞密度过大，请保持细胞密度适当（贴壁细胞可能需要胰酶消化），并更换新的培养皿。
4. 处理 7 天后，可以用支原体检测试剂盒进行检测，检测支原体是否杀灭完全。如果仍有支原体残留，可以考虑再处理 3 天。
5. 以后每隔 1 个月进行支原体的常规检测，以保证没有新的支原体污染。

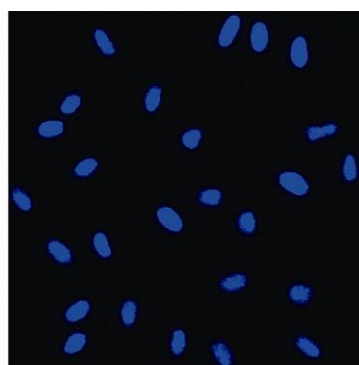
注意事项

- 建议将细胞分成三份：第一份添加清除试剂 1，第二份添加清除试剂 2，第三份同时添加清除试剂 1 和清除试剂 2 进行杀灭（注：同时添加两种药物可能对细胞的毒性较大，但是杀灭的概率会非常高），这样支原体对两种药物同时产生抗性和处理过程中细胞同时死亡的概率会非常低。如果同时添加清除试剂 1 和清除试剂 2，细胞可以每 2 天更换一次培养液。
- 处理过程中，注意每天观察细胞的状况，如果发现支原体清除试剂对细胞的毒性较大，可以加大培养液中的血清浓度或者提高细胞的密度。
- 清除试剂 1 和清除试剂 2 在降低浓度后（使用稀释 10 倍后的支原体清除试剂 1 或者 2，再按 1:500 比例加入，即药物的最终稀释比例为 1:5000）也可以加入到培养液中作为短期（1-2 个月）的支原体污染预防药物，但是不建议在细胞培养液中长期（超过 2 个月）加入，因为有可能导致对该两种药物有抗性的支原体出现。

支原体清除试剂的效果



Before treatment



After treatment

如上图所示，左侧为未经支原体清除试剂处理的人 HeLa 细胞，经 DAPI 染色后，除了细胞核为蓝色外，细胞质也有大量的絮状核酸物质被染成蓝色，这些处于细胞质的核酸物质就是支原体 DNA。而右侧为经过本公司的支原体清除试剂 2 处理 7 天的 HeLa 细胞，经 DAPI 染色后，除了细胞核为蓝色外，细胞质没有任何絮状核酸物质被染成蓝色，说明支原体已经被清除。