

Quick Cell 支原体快速检测试剂盒(细胞培养专用)使用说明书

产品描述

《Quick Cell 快速支原体检测试剂盒》主要用于检测细胞培养上清或别的液体样品（如血清）中是否含有支原体污染，该试剂盒仅用于基础科研。

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。本试剂盒可以检测：（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. arthritidis、（13）M. pulmonis 等几乎所有常见的污染细胞的支原体（注：M.为 Mycoplasma 的缩写）。以上 13 种支原体约占细胞支原体污染的 99%以上，本试剂盒产品全部可以检测。绝大多数支原体污染集中于前 8 种。注意：本试剂盒无法检测 Ureaplasma Urealyticum 支原体！Ureaplasma Urealyticum 在支原体污染种极其罕见。

与 PCR 法检测支原体比较，本试剂盒产品优势优势显著：

比较内容	支原体检测 PCR 法	Quick Cell 快速支原体检测试剂盒
操作时间	3 小时	1 小时
是否需要样品处理	样品需预处理，DNA 提取	无需样品处理，直接使用上清
灵敏度	灵敏度低	较 PCR 法提高 1000 倍
是否需要电泳	需要电泳及染色	不需电泳，目测结果

试剂盒组成

- (1) 溶液 I ：1150 μ L (50 次检测)
- (2) 溶液 II ：50 μ L (50 次检测)
- (3) 溶液 III ：指示剂，50 μ L (50 次检测)
- (4) 阳性支原体 DNA ：50 μ L
- (5) 矿物油 ：1500 μ L

使用方法

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℃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。

2. 反应体系的配制

表 1：恒温反应体系的配制

组 份	理论单个样品用量	样品总数	总体积
溶液 I	23 μL	N	$23 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$
溶液 II	1 μL	N	$1 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$
溶液 III	0.18 μL	N	$0.18 \times N \times 1.08 \mu\text{L}$

(1) 将溶液 I、溶液 III 从 -20°C 冰箱中取出，待其融化后（可在 37°C 水浴内放置 5-10 分钟以帮助融化），从 -20°C 冰箱中取出溶液 II 置于冰上。吹吸均匀后，按表 1 比例，混合溶液 I、溶液 II、溶液 III。如有多个样品，为了防止移液误差，建议溶液 I、II、III 用量乘以系数 1.08，保证每个反应管中的反应液足量。从配液开始的所有步骤，均在冰上操作。

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 I 的总体积为 $23 \times 5 \times 1.08 = 124.2 \mu\text{L}$ ，溶液 II 的总体积为 $1 \times 5 \times 1.08 = 5.4 \mu\text{L}$ ，溶液 III 的总体积为 $0.18 \times 5 \times 1.08 = 0.972 \mu\text{L}$ 将溶液 I、II、III 混合均匀。

注：溶液 II 必须一直在 -20°C 冰箱中保存，并在操作时置于冰上。
溶液 II 即使在 -20°C 条件下仍为液态，不需置于室温。

(2) 将上述配制好的反应体系，吹打均匀后，按每管 $24\ \mu\text{L}$ 分装到 $0.2\ \text{mL}$ 的 PCR 管中。尽量保证每管的反应液体积一样。PCR 管应该使用透明度良好的薄壁 PCR 管。

(3) 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；往阴性对照管 (Negative) 中加入 $1\ \mu\text{L}$ 灭菌水；反应液的总体积为 $25\ \mu\text{L}$ 。

注 1：装有阳性支原体 DNA 的螺口管开盖之前，用力甩一下，或者用迷你离心机即可。

注 2：进行反应体系配制的房间，与进行样品前处理、加阳性对照 DNA、样品 DNA 的房间最好分开。

3. 反应

PCR 仪设置程序： 61°C ， $60\ \text{min}$ ； 10°C , forever；热盖温度， 100°C 。

注意：若实验室反应场所没有 PCR 仪，可用水浴锅代替，水浴锅显示温度与实际温度的温差不超过 0.5°C ，另须往每个反应管内加入 $25\ \mu\text{L}$ 矿物油，以防止水份挥发，然后盖上盖子，将反应管插入带孔的漂板内，放入已经升温到 61°C 的水浴内，准确反应 60 分钟。

4. 结果判断

61°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：在 61℃ 反应的时间必须准确计时，最多不得超过 5 分钟，以免出现假阳性。必须在反应后 2 小时内进行结果判断，避免室温下扩增反应进行，影响结果判别。

注意事项

1 . 必须确保使用的移液枪本身没有残留的支原体，尽量用新购移液器、新开封的枪头操作；整个操作过程，佩戴口罩，不要开口说话。由于本试剂盒非常灵敏，移液枪如吸附有，或者人为带入支原体均有可能造成假阳性。

2 . 最好使用带滤芯的吸头吸取溶液和阳性支原体等。如果没有带滤芯的吸头，至少应该使用新开封的吸头。

3 . 检测过程中，用过的各类吸头、离心管务必小心处理，应装入含有半瓶水的带盖的、可密封的垃圾瓶内。反应后的 PCR 管，不要开盖，用过后将其用自封袋密闭，扔到远离细胞房的独立垃圾桶内。

4 . 如果细胞被支原体污染，可以选购本公司或其他供应商提供的去除试剂尽早去除。