

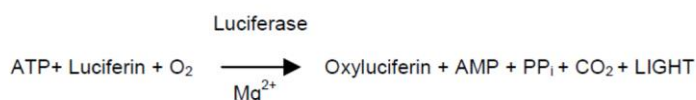


Quick Cell 发光法支原体检测试剂盒

产品描述

Quick Cell发光法支原体检测试剂盒, 通过检测支原体的特异性酶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。通过比较细胞培养上清和未用于细胞培养的培养液上清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。反应原理如下:



订购信息

产品名称	货号	规格
Quick Cell 发光法支原体检测试剂盒	AC16L062	50T

产品组分

组分	规格
A. 试剂 A (已冻干)	2.5 mL (50 次检测)
B. 试剂 B (已冻干)	2.5 mL (50 次检测)
C. 支原体检测溶液	5.5 mL

【注】: 本试剂盒不含阳性对照。

运输与保存

干冰运输。-20°C短期保存, -80°C长期保存; 有效期60个月。

使用方法

1. 检测试剂的准备

产品从-80 °C冰箱取出, 在冰上操作, 第一次使用, 分别用2.5 mL支原体检测溶液溶解试剂A和试剂B。

【注】: 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可分别分装到50个1.5 mL离心管中, 根据待检测的样品数量及阴性对照数量确定A、B试剂的用量 (不用的试剂放置于-80 °C冰箱低温保存, 随用随取)。试剂A和试剂B, 放室温5 min左右 (不能加热), 等其熔解后放冰上待用。



【注】：试剂 A 和试剂 B 只能在每次检测之前从-80 °C冰箱取出的，熔解后在室温放置的时间尽可能的短，不能超过20 min。熔解后，放冰上的时间也不能超2 h。已经融化后的试剂 A 和试剂 B 不能再次冻存使用。

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。阴性对照除了没有培养细胞外其他成分完全相同，包括其中的血清批次、含量、抗生素等含量也必须完全相同。阴性对照配制完后放于4°C冰箱。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

可用已经检测含有支原体污染的样品作为阳性对照。

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，具体操作如下（请严格按照相应的体积进行操作）：

(1) 贴壁细胞待测的细胞培养3 d且汇合度在70-90%左右时，取180 μ L-1500 μ L培养液上清，在普通台式离心机上150 g (大约1000 rpm)低速离心 5 min，准确吸取离心后的上清到一个新的1.5 mL离心管内，丢弃含细胞沉淀的原有离心管。悬浮培养的细胞需要在换液传代后，至少让细胞生长3 d再取培养液进行上述操作。

注：①离心力要严格控制在150g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。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。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，从而导致支原体经测时，哺乳动物细胞内的ATP也被释放到溶液中，从而导致假阳性。

②待测细胞上清样品越多，越有利于支原体污染浓缩富集，1500 μ L培养液上清，经后续处理后，支原体浓度提高10倍左右。

③制备好的待测样品如果不是当天立即检测，放于-80°C冰箱保存，不得放于室温、4°C或-20°C冰箱，样品在-80°C可以保存1 年；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) 将含有上清的1.5 mL离心管，在台式离心机上16000 g (大约13000 rpm) 高速离心5 min，弃去上清。

【注】：切勿让吸头碰到离心管底部，底部为可能含有支原体的沉淀。往离心管内，加入120 μ L先期配好的阴性对照培养液。

(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 min，同样小心吸走离心后的上清并丢弃。【注】：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；注意离心管放置方向与上一次离心时相同。

(4) 向上述经过两次离心清洗的样品中加入115 μ L阴性对照的培养液，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，用于后续支原体检测（够两次检测使用）。此时，总体积仍然约为120 μ L）。

【注】：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. 支原体样品检测

(1) 将溶解后的试剂 A、试剂 B放冰上融化（注意：不能加热），试剂A和试剂B融化后立即用于检测。试剂 A、试剂B融化1 h后，检测灵敏度开始显著降低，试剂 A和试剂 B融化后不能反复冻融使用。

(2) 吸取50 μ L阴性对照、阳性对照和待测样品，分别移入不透明（白色或者黑色均可）的96孔板内，加入



50 μ L冰上放置的试剂 A, 室温反应 15 min。【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。

(3) 吸取50 μ L冰上放置的试剂B, 加入到已反应15 min的上述反应液中, 立即在多功能酶标仪或者发光检测仪 (Luminometer) 上, 以仪器默认的萤火虫荧光素酶 (Luciferase) 的发光检测参数的参数进行发光值的检测, 5 min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: 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。

6. 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)。严重的污染该比值可以达到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)。该样品需要继续培养24-48 h后, 重新检测。如果继续培养24-48 h 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)。

表1: 本试剂盒产品优势

比较内容	支原体检测PCR法	Quick Cell发光法支原体检测试剂盒
操作时间	3 h	0.5 h
是否需要样品处理	样品处理, DNA提取	无需样品处理, 直接使用上清
区分支原体活性	检测DNA, 不能区分支原体死活	检测支原体蛋白, 检出活性支原体
是否需要电泳	需要电泳及染色	不需电泳, 结果目测
假阳性、假阴性可能	有	无

注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。