

发光法支原体检测试剂盒

Cat #: BMC1041

Size: 20 T/200 T

	发光法支原体检测试剂盒		
REF	货号: BMC1041	LOT	批号: 见产品标签
	适用样本: 细胞		
	保质期: -20°C, 避光保存 12 个月		

原理

发光法支原体检测试剂盒利用支原体特有激酶的活性并通过 ATP 依赖的荧光素酶催化的发光反应进行检测, 通过比较检测试剂加入前后 ATP 含量的变化来确定样品是否有支原体污染。支原体被裂解后, 会释放特有激酶与底物相互反应, 可催化 ADP 转换为 ATP。整个实验操作分为两步, 第一步是在样品中加入支原体检测试剂 A 检测样品中原有 ATP 的含量; 第二步是加入支原体检测试剂 B, 如果样品有支原体污染, 其特有的激酶可以催化 ADP 转换为 ATP, 此时检测的就是原有的本底 ATP 含量和由支原体特有酶催化新生成的 ATP 含量的总和。通过计算发光读值 B 与 A 的比值就可以判断是否有支原体污染。如果比值大于 1.2 表示有支原体污染, 比值越大说明污染程度越高, 如果比值小于 0.9 说明没有支原体污染, 如果比值介于 0.9 和 1.2 之间, 建议原细胞 (包含原培养液) 继续培养 24-48 h 之后再测试一次。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	20 T	200 T	
Mycoplasma Assay Buffer	1mL	10 mL	-20°C, 避光保存
Luciferase	1 µL	10 µL	-20°C
Mycoplasma Substrate A	1	1	-20°C, 避光保存
Mycoplasma Reagent B	1 mL	10 mL	-20°C
Postive Control	200 µL	1 mL	-20°C

自备耗材

- 无菌离心管、可调节式移液枪及枪头
- 离心机、96 孔全黑酶标板或全白酶标板
- 灭菌水、PBS 或新鲜培养基
- 发光检测仪或多功能酶标仪

试剂准备

Mycoplasma Assay Buffer: 即用型; 使用前, 平衡到室温; -20°C, 避光保存。

Luciferase: 即用型; -20℃保存。

Mycoplasma Reagent A: 临用前配制; 用 Mycoplasma Assay Buffer 溶解 Mycoplasma Substrate A 中, 然后将溶解后的 Mycoplasma Substrate A 和 Luciferase 加入到 Mycoplasma Assay Buffer 瓶中, 充分混匀后得到 Mycoplasma Reagent A; 按使用需求分装并避光保存于-20℃; 使用前, 平衡到室温。

Mycoplasma Reagent B: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 按使用需求分装-20℃保存。

Postive Control: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 按使用需求分装-20℃保存。

注意: 所有试剂避免反复冻融, 建议分装使用, 分装的容器不能有 ATP 污染。

样本制备

- 1. 贴壁细胞: 细胞消化前取 0.2-1 mL 细胞培养上清, 1,500 rpm 离心 5 min, 取上清液用于检测。
 - 2. 悬浮细胞: 细胞传代时取培养液 0.2-1 mL 细胞培养液, 1,500 rpm 离心 5 min, 取上清液用于检测。
 - 3. 复苏细胞: 冻存细胞解冻后添加进新鲜的完全培养基, 培养 1-2 h 后取 0.2-1 mL 细胞培养液, 1,500 rpm 离心 5 min, 取上清液用于检测。
- 注意:**
- 1. 细胞传代后或消化后, 支原体检测信号将会降低。如在细胞传代或消化后取样检测, 需在传代或消化完毕的 24 h 后取样。
 - 2. 上清样品最好收集后立即检测, 也可以在 4℃放置并当天检测, 或者置于-80℃保存半年内检测。低温保存的样品检测的时候需平衡至室温后才可用于检测。

实验步骤

- 1. 在 96 孔全黑或全白酶标板中分别加入 50 μL 的待检样品、Postive Control、阴性对照 (如灭菌水、PBS、新鲜培养基)。
- 2. 每孔加入 50 μL Mycoplasma Reagent A, 混匀后室温静置 5 min, 然后用多功能酶标仪测定化学发光值 RLU_A。
- 3. 每孔加入 50 μL Mycoplasma Reagent B, 混匀后室温静置 10 min, 然后用多功能酶标仪测定化学发光值 RLU_B。
- 4. 计算比值 (Ratio) =RLU_B/RLU_A。参考表 1, 比值大于 1.2 说明有支原体污染, 比值小于 0.9 表示没有支原体污染, 比值在 0.9-1.2 之间可以将原样品继续培养 24-48 h 后重新检测。

表 1. 发光法支原体检测试剂盒结果分析

Ratio	结果分析	处理方法
< 0.9	阴性	无需处理
0.9-1.2	可疑	继续隔离培养培养 24-48 h 后再进行测试
> 1.2	阳性	细胞灭菌处理后丢弃或隔离后用专用的支原体预防或去除试剂处理

- 注意:**
- 1. 多功能酶标仪每孔的读数时间设置为 1,000 ms, 需严格按照加入 Mycoplasma Reagent B 10 min 后进行检测, 切勿提前或延后, 否则可能会影响比值在临界值附近样品的结果判断。
 - 2. 本方法的最佳实验温度是 20-25℃, 在使用前须确保试剂自然回复到室温, 请勿以水浴加热或其他方式加热试剂, 如需长期存放试剂, 推荐根据每次实验用量进行分装, 并避免反复冻融。
 - 3. 皮肤表面含有大量 ATP, 处理样品和进行实验时需佩戴手套防止样品和试剂污染而造成假阴性或假阳性。
 - 4. 有些样品如添加了特殊药物或使用某些特殊培养液, 可能含有抑制或增强反应的成分而导致假阴性或假阳性, 此时可以将样品稀释 10 倍后再进行检测, 并进一步根据稀释后测定出来的 Ratio 来判定是否有支原体污染。
 - 5. 同一样本使用不同批次试剂盒及不同仪器比值 (Ratio) 会有差异, 但不影响定性判断。

草莓时刻: 除了提供发光法支原体检测试剂盒 (BMC1041), Abbkine 还提供支原体 PCR 检测试剂盒 (BMC1040)、以及一系列细胞培养相关产品, 如胎牛血清 (BMC1020)、培养基 (BMC1010、BMC1011)、青霉素-链霉素 (BMC1030) 等。扫描右侧二维码, 关注 Abbkine 公众号, 了解更多 Abbkine 产品信息。



结果展示

表 2. 发光法支原体检测试剂盒检测数据示例

样品	阴性样本		阳性样品		阴性对照		阳性对照
	HEK293T上清	COS-7上清	Hela上清	10倍稀释	PBS	DMEM	Postive Control
RLU _A	250	241	274	391	302	344	307
RLU _B	80	118	10809	1279	90	109	26484
Ratio	0.32	0.49	39.45	3.27	0.30	0.32	86.27

FAQ

问题	解答
请问该产品对发光检测仪器的灵敏度有要求吗？	推荐使用高灵敏度仪器，如几次检测的比率一直约等于 1，可能与检测仪器的灵敏度有关，可将读数时间从 1 s 调整到 1-10 s 的区间。
配制好的 Mycoplasma Reagent A 溶液可以保存多久？	-20℃避光保存，推荐 3 个月内使用，-80℃避光保存，12 个月内有效。建议分装，避免反复冻融。
发光法相较于 PCR 检测法有何不同？	化学发光法检测更加迅速，可随时且大批量检测细胞培养上清有无支原体污染。
是否可以延长反应时间，增大读数方便计算？	不能，需严格按照操作步骤，不能提前或延后，否则会影响在临界值附近比值的判断。
是否可以改变样本用量，增加检测结果的准确性？	对于 96 孔板，推荐使用 50 μL 样本，可以增加样本量，同时按照比例增加 Mycoplasma Reagent A 和 Mycoplasma Reagent B，样本量不能超过 100 μL；不建议减少样本、Mycoplasma Reagent A 和 Mycoplasma Reagent B，检测值在背景附近可能会影响比值及结果判断，可以稀释样本检测。

相关产品

Catalog No.	Product Name
BMC1010	DMEM 高糖培养基（含酚红）
BMC1011	RPMI-1640 培养基（含酚红）
BMC1020	特级胎牛血清
BMU109-CN	SuperKine™ 胰蛋白酶消化液（0.25%胰酶，含酚红）
BMU110-CN	SuperKine™ 胰蛋白酶消化液（0.25%胰酶，不含酚红）
BMU108-CN	SuperKine™ 快速细胞冻存液（无血清/无蛋白）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

