

## QuickCell 支原体快速检测试剂盒(细胞培养专用)

### 产品描述:

QuickCell 支原体快速检测试剂盒(细胞培养专用)是专门用于快速检测细胞培养上清或别的液体样品(如血清)中是否存在支原体污染的试剂。本试剂盒操作简单,反应时间短,只需吸取 1 $\mu$ l 细胞培养上清加入反应体系中,60 $^{\circ}$ C 孵育 1h,肉眼观察即可判定结果,与传统检测支原体的 PCR 法优势明显。本试剂盒检测范围广,可以检测:(1)M.Hyorhinitis、(2)M.Fermentans、(3)M.Arginini、(4)M.hominis、(5)M. orale、(6)M. salivarium、(7)M.pirum、(8)AcholeplasmaLaidlawii、(9)M.agalactiae、(10)M.bovis、(11)M.buccale、(12)M. arthritis、(13)M.pulmonis 等几乎所有常见的污染细胞的支原体(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。绝大多数支原体污染集中于前 8 种。因此非常适合于与细胞生物学相关的科研实验室及企业的日常支原体检测。【注】:快速法不能检测尿解,肺支原体。

### 订购信息:

产品名称	货号	规格	价格
QuickCell 支原体快速检测试剂盒 (细胞培养专用)	YL0041	50T	1350

### 产品组分:

产品组分	规格
溶液 I	1150 $\mu$ l(50 次检测)
溶液 II	55 $\mu$ l(50 次检测)
溶液 III	指示剂, 38 $\mu$ l(50 次检测)
阳性支原体 DNA	50 $\mu$ l
矿物油	1500 $\mu$ l

【注】: ①本试剂盒所指 50 次测试包含阴性对照、阳性对照,并非 50 个样品,因每次测试均需设置对照,测试样品数根据实验安排确定,理论上一次最多可测试 48 个样品。②使用前用离心机轻微离心,以免管壁上粘附损失试剂减少检测次数。

### 运输与保存:

蓝冰运输。-20 $^{\circ}$ C 保存,有效期 36 个月。

### 实验操作流程:

#### 1.待测细胞培养上清收集

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 3d 且汇合度 70-90%左右的细胞培养上清(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 3d 再取培养液进行检测,哺乳动物细胞的存在不会影响检测结果。细胞培养上清可直接用于检测,但样品中如果含有 EDTA 等影响支原体 DNA 扩增的成分,建议进行样品处理,处理过程如下:

样品处理:(1)根据浓缩倍数,可以取 100-1500 $\mu$ l 上述待测样品到 1.5ml 离心管内,在普通台式离心机上 1000rpm 低速离心 5min,将离心后的上清转移到另一个离心管内,丢弃细胞沉淀。(2)将上清继续 13000 rpm (约 16000g) 高速离心 5min,小心吸走全部上清,用 50 $\mu$ l 5mM Tris-HCl, pH8.5 (样品可以长期保存。推荐)或者去离子水重悬沉淀(沉淀中含有支原体),吹吸均匀(如果最初使用了 1500 $\mu$ l 的样品,则支原体浓度大约提高了 30 倍)。(3)该重悬后的样品可以直接检测,也可以进行热处理后再检测(热处理后,样品保存更稳定)。热处理过程:95 $^{\circ}$ C 加热处理 5min (可以转移到 PCR 管内,在 PCR 仪上进行加热处理),简单离心(1000g, 5sec)后,取上清进行检测。

【注】:收集的待测细胞培养液样品如果不立即检测,请放于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,不得放于室温或 4 $^{\circ}$ C 冰箱。样品在 -20 $^{\circ}$ C 至少可以保存 1 个月,在 -80 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,而后一起检测。

#### 2.反应体系的配制

组份	单个样品用量 (μL)	样品总数	N 个样品用量 (μL)
溶液 I	22.5	N	22.5×N×1.06
溶液 II	1	N	1×N×1.06
溶液 III	0.5	N	0.5×N×1.06

表 1: 恒温反应体系的配制

(1) 将溶液 I、溶液 III 从 -20°C 冰箱中取出, 室温放置待其融化, 溶液 II 从 -20°C 冰箱中取出后置于冰上备用。溶液 II、III 使用前各需 1000rpm 离心 30sec, 用移液枪吹洗均匀。三种试剂按表 1 比例混合。

**【举例】:** ①如果待测样品为 8 个 (加上 1 个阴性和 1 个阳性对照), 则样品总数为 10 个。溶液 I 的总体积为  $22.5 \times 10 \times 1.06 = 238.50 \mu\text{L}$ 。溶液 II 的总体积为  $1 \times 10 \times 1.06 = 10.60 \mu\text{L}$ 。溶液 III 的总体积为  $0.5 \times 10 \times 1.06 = 5.3 \mu\text{L}$ 。将溶液 I、溶液 II 和溶液 III 混合均匀即可。②如果打算一个试剂盒一次使用完毕, 可以按照以下方法进行配制: 直接往整管溶液 I (1150μL) 中加入 50μL 溶液 II 和 25μL 溶液 III, 混合均匀即可。如果一次使用完毕, 一个试剂盒大概可以检测 48-49 个样品。

**【注】:** ①总体积中多配制 6% (如果觉得该比例不合适, 可以自己调整), 是为了防止移液误差, 以保证每个反应管中的反应液足量。②溶液 I 和溶液 III 使用完后, 请继续放回 -20°C 冰箱中保存。③溶液 II 必须一直在 -20°C 冰箱中保存 (溶液 II 在 -20°C 不会冻住), 不能放于室温。④溶液 II 和溶液 III 开盖之前, 请离心一下。

(2) 将上述配制好的反应体系, 吹打均匀后, 按每管 24μL 分装到 0.2mL 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 1μL 待测细胞培养液; 往阳性对照管 (Positive) 中加入 1μL 阳性支原体 DNA; 往阴性对照管 (Negative) 中加入 1μL 灭菌水; 反应液的总体积为 25μL。

**【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。

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, 60min; 10°C, forever; 热盖温度, 105°C。

**【注】:** 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 25μL 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 60min。

### 4. 结果判断

61°C 反应 60min 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°C 反应的时间必须准确计时, 最多不得超过 5min, 以免出现假阳性。必须在反应后 2h 内进行结果判断, 避免室温下扩增反应进行, 影响结果判别。