

支原体污染检测试剂盒（发光法）

说明书修订日期：2021.09.01

Cat number: KGY017/KGY017-1

Store at -20°C for 12 months

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒说明

凯基生产的发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)是一种通过化学发光法检测培养的细胞等生物材料中是否有支原体污染的试剂盒。该试剂盒也可用于高灵敏度的仪器，此时读值比较高，但对支原体的检测灵敏度略差一些，即阳性样品的比值会低一些。

本试剂盒原理主要利用支原体特有酶的活性并通过ATP依赖的萤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量的变化来确定样品是否有支原体污染。整个检测过程只有两个步骤，仅需约15分钟。第一步是在样品中加入支原体检测试剂A，5分钟后进行检测，读值为A，此时检测的是样品中原有的ATP的量；第二步是加入支原体检测试剂B，10分钟后进行检测，读值为B，此时如果样品有支原体污染，其特有的酶可以将支原体检测试剂B中的ADP转换为ATP，此时检测的就是原有的本底ATP量和由支原体特有酶催化新生成的ATP量的总和。通过计算读值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小时之后再测试一次。

本试剂盒可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染，在细胞培养过程中可随时取少量培养液上清监测是否有支原体污染。

本试剂盒萤光信号稳定性好，在加入支原体检测试剂A后，萤光信号稳定，在5分钟时即可检测；加入支原体检测试剂B后，如果是无支原体污染样品，原有萤光信号会有一定程度的下降，而如果是有支原体污染样品，萤光信号会随时间延长而增强，10分钟时即可检测。

二、试剂盒组份

组份	Cat: KGY017 20assays	Cat: KGY017-1 100assays	保存条件
支原体检测试剂A	1 ml	5 ml	-20°C，避光
支原体检测试剂B	1 ml	5 ml	
阳性对照	200ul	0.5 ml	

-20°C保存，一年有效；-80°C保存，两年有效。

三、操作步骤

1.试剂和检测样品准备:

a.所有试剂使用前要平衡至室温，最适宜的温度是20-25°C。

b.检测样品准备：取0.2-1ml培养3-6天的细胞上清(培养时间较短的细胞上清也可以检测，但上清中释放的支原体较少，检测灵敏度会显著下降)，200×g (约1500rpm)离心5分钟以沉淀少量漂浮的细胞或细胞碎片，取上清。上清样品

最好收集后立即检测，也可以在室温或4°C放置并当天检测，或者置于-80°C保存半年内检测。低温保存的样品检测的时候须室温融化并达到室温后才可用于检测。

2. 实验操作

- a. 在检测板中加入50μl的检测样品、阳性对照、阴性对照(如无菌水或PBS、新鲜培养液)。
- b. 加入50μl的支原体检测试剂A，混匀，20-25°C放置5分钟。然后用多功能酶标仪进行化学发光检测，即读值为A。请根据仪器要求设置相应的参数，每个孔的检测时间一般为0.25-1秒或更长时间，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。
- c. 加入50μl的支原体检测试剂B，混匀，20-25°C放置10分钟。然后用多功能酶标仪进行化学发光检测，即读值为B。
注：请严格按照加入支原体检测试剂B后10分钟进行检测，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。
- d. 计算比值(Ratio)=读值B/读值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小时后重新检测。检测结果分析见下表。

B/A比值	结果分析	处理方法
<0.9	支原体阴性，无支原体污染	无需处理，定期检测
0.9-1.2	临界值，结果较可疑	样品隔离培养24~48小时后再进行测试
>1.2	支原体阳性，有支原体污染	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

备注1：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B/A比值来判定是否有支原体污染。

备注2：本试剂盒可以检测出常见的44种支原体污染，但是不能具体区分是何种支原体污染。

e. 本试剂盒用ThermoFisher的多功能酶标仪Varioskan LUX检测一些常见样品的示例结果请参考表2。阳性对照(Positive Control)为试剂盒中提供的阳性对照，常用溶剂(Common Solvents)为超纯水(Water)和PBS，常用细胞培养液(Common Culture Medium)为RPMI-1640和DMEM，阳性样品(Positive Samples)为支原体污染的HeLa细胞培养上清(其中10倍稀释为按1:9用PBS稀释)，阴性样品(Negative Samples)为无支原体污染的BEAS-2B和293T细胞培养上清。本试剂盒提供的阳性对照，由于反复冻融导致部分失活等因素，实际测定出来的比值可能会和表2和图2中所列数据有较明显的偏差。而超纯水、PBS、RPMI-1640和DMEM检测出来的比值数据和所列数据会相对比较接近。实际测定出来的读值A和B，不同的仪器设备可能会有非常大的差别。

样品	阳性对照	常用溶剂		常用细胞培养液		阳性样品		阴性样品	
	C0297S-3/ C0297M-3	超纯水	PBS	RPMI-1640	DMEM	HeLa 培养上清	10倍 稀释	BEAS-2B 培养上清	293T 培养上清
读值A	17975	26525	23925	23990	24390	36685	25550	24825	24960
读值B	197150	15865	14970	15910	15630	166200	38265	16445	16760
比值(B/A)	10.97	0.60	0.63	0.66	0.64	4.53	1.50	0.66	0.67

注：ThermoFisher的多功能酶标仪Varioskan LUX为高灵敏度仪器，所以读值较高，实际在低灵敏度仪器中，读值可能在几十至上千。

四、注意事项

- 支原体检测试剂A中含有荧光素酶，反复冻融会导致其逐渐失活。尽管经测试反复冻融5次对于其检测效果无显著影响，为取得良好的使用效果，第一次解冻后可适当分装保存，但需注意分装的容器不能有ATP污染。反复冻融过程中，可能会导致检测试剂中出现少量沉淀，此时宜平衡至室温，并尽量溶解。如仍有残留的不溶物，可以离心去除后使用，经测试不会影响后续的检测效果。
- 阳性对照须避免反复冻融，可适当分装后保存。
- 检测时强烈建议使用白色96孔板，如果使用普通透明的96孔板，相邻孔之间可能会产生相互干扰。

- 当检测对象是细胞时，需正常培养细胞至少24小时以上，3-6天更佳，然后直接使用未经胰酶消化的细胞培养液上清作为样品；当检测对象是一些支原体含量极其微量的样品时，如细胞培养用的血清、胰酶、抗生素、培养液，最好经过2-3天的培养后再测试。培养时间过短，很可能会导致本产品无法检测出支原体污染。
- 由于某些贴壁细胞培养液上清中有少量细胞或对于悬浮细胞的培养液，室温200×g离心5分钟后取上清检测，否则背景值会比较高。
- 检测时请在室温20-25°C左右进行，否则会影响检测效果。化学发光反应和支原体特异性酶催化的反应都受温度影响，检测试剂、检测样品都必须平衡至室温才可以进行检测。
- 人体皮肤表面有丰富的ATP，检测时请戴好手套，防止污染试剂。其它耗材也需洁净、无污染。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录： 本试剂盒检测支原体种类参考表

Species	Origin/Source	Species	Origin/Source
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Mammalian/Avian	<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	Mammalian/Avian
<i>Acholeplasma modicum</i>	Bovine	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Avian
<i>Acholeplasma morum</i>	Mammalian	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Human
<i>Mesoplasma entomophilum</i>	Insect	<i>Mycoplasma hominis</i>	Human
<i>Mesoplasma florum</i>	Plant/Insect	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Human
<i>Mycoplasma agussizii</i>	Tortoise	<i>Mycoplasma hyorhinae</i>	Porcine
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	Bovine	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	Porcine
<i>Mycoplasma alligatoris</i>	Alligator	<i>Mycoplasma iguanae</i>	Iguana
<i>Mycoplasma arginini</i>	Bovine/Porcine	<i>Mycoplasma lipophilum</i>	Human
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	Human	<i>Mycoplasma muris</i>	Murine
<i>Mycoplasma bovirhinae</i>	Bovine	<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	Murine
<i>Mycoplasma bovis</i>	Bovine	<i>Mycoplasma opalescens</i>	Canine
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	Bovine	<i>Mycoplasma orale</i>	Human
<i>Mycoplasma buccale</i>	Human	<i>Mycoplasma pirum</i>	Human
<i>Mycoplasma californicum</i>	Bovine	<i>Mycoplasma pneumonia</i>	Human
<i>Mycoplasma canadense</i>	Bovine	<i>Mycoplasma primatum</i>	Mammalian
<i>Mycoplasma cloacale</i>	Avian	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Human
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	Ovine & Caprine	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Rat
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	Crocodile	<i>Mycoplasma salivarium</i>	Human
<i>Mycoplasma equirhinae</i>	Equine	<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Human
<i>Mycoplasma faucium</i>	Human	<i>Mycoplasma synoviae</i>	Avian
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Human	<i>Spiroplasma citri</i>	Plant/Insect