



MycoCheck™ Mycoplasma Luminescent Detection Kit

—— MycoCheck™ 发光法支原体检测试剂盒

产品货号	包装规格
A066-1	20 次

储存条件：-20℃，避光保存。

产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

ABP Biosciences Inc

武汉市东湖新技术开发区高新大道666号

光谷生物城生物创新园 C2-4 栋 5 楼

电话：400-066-7718

邮箱：info@abpbio.com

网址：www.abpbio.com (英文)

www.abpbio.com.cn (中文)

MycroCheck™ Mycoplasma Luminescent Detection Kit

产品货号: A066-1

试剂盒组份:

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	Mycoplasma Detection Reagent A	1 mL	冻干粉	-20 °C, 避光
组份 B	Mycoplasma Detection Reagent B	1 mL	冻干粉	-20 °C
组份 C	Mycoplasma Assay Buffer	10 mL	1× solution	4 °C

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年。

产品介绍

支原体 (*Mycoplasma*) 是最小、最简单的原核生物。支原体有如下特征: 支原体无细胞壁结构, 所以针对细胞壁的许多常见的抗生素, 如青霉素或 β -内酰胺类抗生素对支原体无效; 支原体大小介于细菌和病毒之间, 约为 0.2-0.8 μm , 所以部分支原体可通过 0.22 μm 滤器, 常规的过滤对支原体无效; 很多支原体由于自身的生物合成能力有限而依靠宿主提供营养, 所以通常吸附或散落在细胞表面和细胞之间。支原体的这些特征使细胞培养过程中存在支原体污染的风险, 细胞的支原体污染已经成为一个世界性的普遍问题。支原体污染可能会严重影响细胞的状态, 使细胞的基因表达、代谢特征发生变化, 导致细胞生长减缓、分化和死亡异常, 严重影响细胞功能。这些影响因素会严重影响实验结果的可靠性、可重复性和一致性, 因此支原体污染的检测非常重要。

MycroCheck™ 发光法支原体检测试剂盒是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 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。

实验所需耗材（不包含在试剂盒中）

- 化学发光仪或者具有检测化学发光功能的酶标仪、和酶标仪配套使用的化学发光检测专用的 96 孔板。
- 无菌离心管、枪头及移液枪

试剂和检测样品准备

1. 所有试剂使用前要平衡至室温。首次使用时，往组分 A 中加 1 mL Mycoplasma Assay Buffer (组份 C)，摇匀后室温静置 10 分钟；往组分 B 中加 1 mL Mycoplasma Assay Buffer (组份 C)，摇匀后室温静置 10 分钟。如需多次使用，建议分装后冷冻保存。
2. 检测样品准备：取 0.2-1 mL 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。

实验步骤

1. 在检测板中加入 50 μL 的检测样品。
2. 加入 50 μL Mycoplasma Detection Reagent 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 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。
3. 加入 50 μL Mycoplasma Detection Reagent 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。
4. 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。

表 1. MycoCheck™ 发光法支原体检测试剂盒的结果分析。

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