



细胞支原体检测报告

细胞名称: **DLD-1**

检测日期: **2016.12.10**

检测原理: 发光法支原体检测通过检测支原体含有的特异性 ATP 合成相关酶的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。具体的反应如下:



通过比较细胞培养上清和未用于细胞培养而成分完全相同的培养液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。

实验基本步骤:

1、检测试剂的准备

检测试剂为冻干品, 溶解前, 放-80℃冰箱低温保存。第一次使用前, 在冰上操作, 分别用 2.5 mL 支原体检测溶液溶解试剂 A 和试剂 B, 按每管 50 μL 分别分装到 50 个 1.5 mL 离心管中, 在-80℃冰箱低温保存。使用时, 根据待检测的样品数量和阴性对照数量, 从-80℃冰箱取出相应数量的试剂 A 和试剂 B, 放室温 5 分钟左右 (注意: 不能加热), 等其溶解后放冰上待用。

注意: 试剂 A 和试剂 B 只能在每次检测之前从-80℃冰箱取出的, 溶解后在室温放置的时间

尽可能的短，不能超过 20 分钟。溶解后，放冰上的时间也不能超 2 小时。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

每次检测都必须设置阴性对照。阴性对照必须使用配制完后放于 4℃ 冰箱，未用于细胞培养但成分完全相同的培养液，包括其中的血清、抗生素等含量也必须完全相同。特别是其中的血清含量和批次，对发光的本底值影响很大，作为阴性对照的培养液，其中添加的血清，必须与用于细胞培养的血清批次相同且含量完全相同。例如：如果用于细胞培养的培养液为含有 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM，那么阴性对照也应该使用含有相同批次的 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM。如果用于细胞培养的培养液为无血清培养液，那么阴性对照也应该使用无血清但成分相同的培养液。

3、 待测样品的准备 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 3 天且汇合度在 70-90% 左右的细胞培养液上清（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 3 天再取培养液进行检测。具体操作如下（请严格按照相应的体积进行操作）：

（1）取 180 μL 上述待测样品，在普通台式离心机上 200 g（大约 1500 rpm）低速离心 5 分钟，准确吸取离心后的上清 120 μL 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。注意：本步骤为样品检测之前必不可少的步骤，低速离心是为了去除哺乳动物细胞，以排除其对支原体检测的干扰。所以离心力要严格控制在 200 g 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。如果错误使用更高的离心力将可能导致支原体也被离心下来，可能导致假阴性。而如果错误使用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，从而导致支原体检测时，哺乳动物细胞内的 ATP 也被释放到溶液中，可能导致假阳性。

(2) 将含有 120 μL 上清的新的 1.5 mL 离心管, 在普通台式离心机上 16000 g (大约 13000 rpm) 高速离心 3 分钟, 小心吸走 108 μL 离心后的上清并丢弃 (注意: 切勿让吸头碰到离心管底部, 因为底部为可能含有支原体的沉淀。留下大约 12 μL 培养液的目的也是为了防止吸头碰到离心管底部而将可能含有支原体的沉淀吸走)。往离心管内, 加入 108 μL 作为阴性对照的培养液, 并上下吹吸 10 次, 将可能含有支原体的沉淀吹打均匀。至此, 该样品方可用于后续的支原体检测。注意: 本步骤也是样品检测之前必不可少的步骤, 高速离心是为了将支原体沉淀下来, 而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。

4、待测样品的保存 收集并经过低速离心去除细胞和经过高速离心替换成阴性对照培养液的待测样品, 如果不是当天立即检测, 请放于 -80°C 冰箱保存, 不得放于室温、 4°C 或 -20°C 冰箱。样品在 -80°C 可以保存一年左右。注意: (1) 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) 未经过低速离心去除细胞和未经过高速离心替换成阴性对照培养液的待测样品, 不得直接放 -80°C 冰箱保存。

5、检测之前, 必须将溶解后的试剂 A、试剂 B、阴性对照和待测样品放在室温 10 分钟左右 (注意: 不能加热), 以便其温度与室温相同, 本试剂盒的最佳反应温度为 $18-30^{\circ}\text{C}$, 必须确保室温不低于 15°C 。

6、吸取 50 μL 阴性对照或者已经经过低速离心去除细胞和经过高速离心替换成阴性对照的培养液的待测样品, 放入白色或者黑色不透明的 96 孔板内, 加入 50 μL 试剂 A, 室温反应 15 分钟。

7、加入 50 μL 试剂 B, 室温反应 3 分钟后, 在具有发光检测功能的多功能酶标仪或者单独

的发光检测仪 (Luminometer) 上, 以仪器默认的参数 (注意: 不要加载任何的滤光片) 进行发光值的检测, 5 分钟内, 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。

检测优势:

- 1、 发光法支原体检测的是活支原体, 只有样品中存在活的支原体, 才会生产阳性结果, 可以区分支原体的死活。而一步法恒温支原体检测和 PCR 法支原体检测都是检测支原体的 DNA, 不论支原体的死活, 样品中只要有支原体 DNA 的存在, 就会生产阳性结果, 所以无法区分支原体的死活。细胞培养中, 最关心的是细胞培养液上清或者血清、胰酶等成分中, 是否有活的支原体。而如果仅有死的支原体或者一些残存的支原体 DNA, 是无关紧要的。
- 2、 不存在假阳性。由于一步法恒温支原体检测和 PCR 法支原体检测都需要对支原体 DNA 进行大量的扩增, 检测过程中, 只要有微量的支原体 DNA 或者扩增产物的污染, 就会出现假阳性。而发光法支原体检测只检测活的支原体, 不存在扩增产物污染样品的问题。
- 3、 不存在因反应被抑制导致的假阴性。由于细胞培养数天后, 培养液中经常含有严重抑制 PCR 扩增的代谢物, 所以使用 PCR 法支原体检测经常会出现假阴性的问题。该问题在发光法支原体检测中不存在。
- 4、 发光法支原体检测对支原体的识别率极高, 近 20 种细胞培养中出现过的支原体全部含有该酶, 所以这些支原体全部可以被发光法支原体检测识别。目前为止, 100 多种已知的支原体中, 只发现这一种支原体不含有该酶, 而这种支原体在细胞培养中出现的概率几乎为零, 所以该方法支原体的识别率应该在 99.99% 以上。

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）。但该样品需要继续培养 24-48 小时后，重新检测。如果继续培养 24-48 小时后，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）。

检测报告单

检测次数	1	2	3	4	5
检测数据	2728	2733	2745	2749	2780
阴性对照	191	192	198	201	203

结论：支原体检测为阴性[] 阳性[☒]。

赛百慷（上海）生物技术股份有限公司 地址：
上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 2 楼 电话：
400-021-2021 网址：www.icellbioscience.com