

MycobBlue Mycoplasma Detector

D101

Version 21.1



产品概述

MycobBlue Mycoplasma Detector是针对细胞培养物支原体污染快速检测的试剂，使用简便快捷，只需吸取1 μl细胞培养液上清加入反应体系中，60°C孵育1 h，肉眼观察即可判定结果。无需PCR/qPCR仪，无需电泳，在细胞房内即可轻松完成。与常用的PCR法相比，MycobBlue Mycoplasma Detector对培养液上清中的抑制物耐受度更强，因此不会出现弱阳性、假阴性；反应完成后无需开盖电泳，避免了扩增产物气溶胶造成的假阳性；检测结果与目前最灵敏、最准确的qPCR法具有极高的一致性。

经验证，MycobBlue Mycoplasma Detector可检测多达28种支原体，其中包括细胞培养常见的8种支原体；适用于各种悬浮、贴壁培养细胞，包括CHO、Vero、杂交瘤、Sf9、293等，且具有广泛的培养基兼容性，因此非常适合于生物制药企业、疫苗生产企业、单抗生产企业、细胞治疗/胚胎实验室以及科研实验室的日常支原体检测。

产品组分

| 组 分 | D101-01 20 rxns | D101-02 50 rxns |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| MycobBlue Buffer* | 480 μl | 1.2 ml |
| MycobBlue Enzyme | 20 μl | 50 μl |
| Positive Control | 10 μl | 25 μl |
| 石蜡油 | 500 μl | 1.25 ml |

* 包含显色剂。

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

自备材料

PCR仪或水浴锅

注意事项

试剂保存过程中拧紧管盖，保持密封。

适用范围

MycobBlue Mycoplasma Detector适用于各种悬浮、贴壁培养细胞，并对培养基、血清种类具有广泛兼容性。经验证的细胞和培养基血清包括(但不限于)：

悬浮细胞：CHO、NS0、293F、小鼠杂交瘤、Sf9、BHK21等；

贴壁细胞：Vero、MDCK、SP2/0、293T、HepG2、HeLa、A549、MB-MDA231、L929、MEF等；

培养基：CD FortiCHO、CDM4、Expi 293 Medium、CD Hybridoma、Grace、DMEM、1640、F12等；

血清：胎牛/小牛血清、马血清、Gibco KSR血清替代物等。

实验流程

1. 获得细胞培养液上清

贴壁细胞：直接吸取上清。建议在细胞传代或换液3天以上，并且汇合度达到90%左右时取样，此时上清中支原体含量较高，便于检出。

悬浮细胞：2,300 rpm (500 × g) 离心5 min后，吸取上清。建议在细胞传代或换液3天以上时取样，此时支原体含量较高，便于检出。

2. 配制反应体系

将MycobBlue Buffer从-30 ~ -15°C取出，待解冻后，颠倒混匀。根据待检测样品数量在微量离心管中配制如下反应体系：

| 组 分 | 单次反应体积(μl) | |
|------------------|------------|--------------------------------------|
| MycobBlue Buffer | 24 | |
| MycobBlue Enzyme | 1 | ×样品数 ^a × 1.1 ^b |

a. 可根据需要，每次实验加上一个阴性对照、一个阳性对照；

b. 移液器存在移液误差，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液，以弥补损耗。

用移液器轻轻吹打混匀，分装到PCR管或微量离心管中，每支反应管25 μl。

3. 加样

样品：向反应管中加入1 μl 待测培养液上清

阳性对照：加入1 μl Positive Control

阴性对照：不加入任何样品或加入1 μl 无菌水

▲如果反应是在水浴锅中进行，则在每管中加入25 μl 石蜡油，以防止液体蒸发导致结果不准确。加入石蜡油时请注意更换枪头，防止样品之间交叉污染。

▲如果反应是在PCR仪中进行，不需要加入石蜡油。

4. 反应

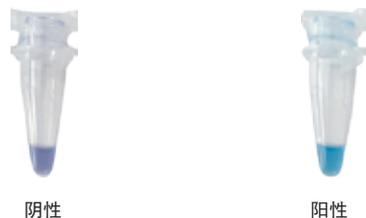
将水浴锅或PCR仪温度设置成60℃，放入反应管，孵育60 min。

▲水浴锅实际温度可能与设置温度有所偏差，建议先用温度计进行校准。实际上58 ~ 64℃反应都可以进行，但会影响检测灵敏度。

▲不建议使用烘箱进行反应。

5. 结果判定

在一个光线良好的环境中观察反应液颜色(建议以白纸为背景)。如果反应液颜色仍为紫色，则判定为支原体阴性；如果反应液颜色变成天蓝色，则判定为支原体阳性。在少数情况下(如支原体含量较低)，反应液颜色可能会介于紫色和天蓝色之间，此时可将反应时间持续延长到75 - 90 min, 如果颜色变为天蓝色，则判定为阳性，否则判定为阴性。颜色反应如下图所示，以阴性对照与阳性对照作为参考。



▲反应产物不可开盖，否则产生的气溶胶会导致后续检测假阳性的出现。建议将反应管包扎在塑料袋或手套中，丢弃到专用垃圾桶中，并及时清理。

常见问题及解决方案

◇ MycoBlue Mycoplasma Detector 的灵敏度是多少？如何保证检测灵敏度？

MycoBlue Mycoplasma Detector 可从 1 μl 培养液上清中准确检出至少 500 cfu 的支原体，即灵敏度为 5×10^5 cfu/ml。通常情况下，培养液上清中的支原体含量在 $10^6 - 10^9$ cfu/ml 之间，该试剂可以满足绝大多数实验的需要。据文献报道，单个支原体感染细胞后，在 3 - 5 天内可增殖至 10^6 cfu/ml。因此，建议在换液或传代 3 天后再进行检测。

◇ 加入培养基上清后，反应液立即变色；或者反应结束后，反应液颜色呈现紫色与天蓝色以外的颜色，是什么原因？如何解决？

在极少数情况下，培养基成分会对 MycoBlue 试剂的颜色产生干扰，比如 Cell Boost 5(Hyclone) 会使 MycoBlue 试剂呈现出粉红色。

处理方法：①取少量培养液上清或细胞悬液，2,300 rpm (500 × g) 离心 5 min，收集上清；②高速离心 (>11,200 rpm (12,000 × g)) 5 min，使上清中可能存在的支原体沉淀。弃掉大部分上清，保留约 50 μl；再加入 950 μl 无菌水，用移液器吹打混匀；③重复步骤②三次，弃掉大部分上清，保留约 50 μl；④取 1 μl 进行检测

◇ 操作过程中如何避免出现假阳性？

最重要的是反应结束后，避免开盖，否则反应产物会产生气溶胶污染，导致后续检测出现假阳性。另外，加样时注意更换枪头，并将阳性对照放在最后一管加入，也可以进一步降低假阳性出现的风险。

◇ 如果出先支原体污染如何补救？

若发现细胞存在支原体污染，建议直接丢弃，防止污染其它细胞。可尝试使用 Myco-Off Mycoplasma Cleaner (Vazyme #D103)，对细胞进行挽救。

◇ MycoBlue Mycoplasma Detector 可以检测多少种支原体？

MycoBlue Mycoplasma Detector 可以准确检出 28 种支原体：

| | | | | | |
|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>A. laidlawii</i> * | <i>M. salivarium</i> * | <i>M. neophronis</i> | <i>M. primatum</i> | <i>M. gallinarum</i> | <i>M. lipophilum</i> |
| <i>M. hominis</i> * | <i>M. pirum</i> * | <i>M. timone</i> | <i>M. leopharyngis</i> | <i>M. sphenisci</i> | <i>M. falconis</i> |
| <i>M. arginini</i> * | <i>M. orale</i> * | <i>M. caviae</i> | <i>M. maculosum</i> | <i>M. bovigenitalium</i> | <i>M. alkalescens</i> |
| <i>M. fermentans</i> * | <i>A. granularum</i> | <i>M. alvi</i> | <i>A. oculi</i> | <i>M. auris</i> | |
| <i>M. hyorhinitis</i> * | <i>A. pleciae</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. iners</i> | <i>M. columbinum</i> | |

* 超过 95% 以上的细胞是被这 8 种支原体所污染。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。