



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

Myco-Zero™支原体去除试剂

产品编号	产品名称	包装
C0280S	Myco-Zero™支原体去除试剂	5次
C0280M	Myco-Zero™支原体去除试剂	20次
C0280L	Myco-Zero™支原体去除试剂	100次

产品简介:

- 碧云天生产的Myco-Zero™支原体去除试剂，英文名称为Myco-Zero™ Mycoplasma Removal Agent (MRA)或Myco-Zero™ Mycoplasma Elimination Reagent，简称Myco-Zero™，是一种用于快速、高效去除细胞培养过程中广泛存在的支原体污染的非抗生素类试剂。本产品是一种真正能彻底去除、杀灭支原体的试剂，去除后即可撤去，无须长期维持，适合各种被支原体污染细胞、病毒及相关试剂的处理，特别适合被支原体污染的珍贵细胞或已污染支原体但需要保种细胞的支原体去除。本产品与Minerva Biolabs公司的Mynox®为同类产品，效果基本一致。
- 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0.2-0.8μm，所以部分支原体可通过0.22μm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，因此去除支原体污染非常重要[1]。
- 本产品可快速、高效的清除细胞培养过程中出现的支原体，根除效率近100%。市售的支原体清除试剂大多是四环素类、大环内酯类和喹诺酮类抗生素，它们主要是对支原体产生抑制作用，并非直接杀死支原体，因此作用比较慢且效果不能持久[2-4]。本产品主要成分是一种多肽类表面活性剂，源自枯草杆菌发酵后的提取物。基于微生物的理化原理，Myco-Zero™选择性地与支原体膜特异性结合，改变支原体膜的通透性，从而导致支原体破裂死亡。基于该特性，支原体产生耐药的可能性极低。本产品仅需使用一次、作用5-8天即可几乎永久有效地消除培养细胞中的支原体。清除支原体后，细胞可以立即恢复其自然形态和正常增殖速率。
- 本产品对被支原体污染的贴壁细胞HeLa和HCT-116、悬浮细胞MOLM-13和THP-1的支原体去除效果参见表1，经碧云天的Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)(C0297)检测出的支原体阳性细胞，用Myco-Zero™作用5-8天后，支原体再次检测结果为阴性，转阴后细胞状态很稳定，在传代培养至数十代的过程中细胞支原体检测始终呈阴性。支原体检测阳性的细胞转阴时间与细胞种类、细胞状态、细胞数量及支原体种类、支原体污染严重程度等密切相关，表中数据仅供参考。

Cell lines	Ratio before Treatment	Ratio after Myco-Zero™ Treatment									
		1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*
HeLa	2.87	0.62	0.32	0.42	0.32	0.29	0.36	0.36	0.55	0.76	0.70
HCT-116	5.02	0.95	0.64	0.28	0.51	0.39	0.33	0.70	0.63	0.75	0.66
MOLM-13	5.81	1.21	0.72	0.58	0.49	0.50	0.49	0.61	0.56	0.80	0.62
THP-1	2.69	0.94	0.90	0.90	0.86	0.65	0.67	0.81	0.77	0.80	0.66

表1. 碧云天Myco-Zero™支原体去除试剂(C0280)对支原体阳性的HeLa、HCT-116、MOLM-13、THP-1细胞去除支原体污染前后的检测数据示例。

注1: 表中的1*、2*等数字代表细胞经Myco-Zero™处理5-8天后的传代次数。

注2: 碧云天的Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)(C0297)通过计算读值B与A的比值来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。

- 本产品不含抗生素，不会使支原体发生耐药反应，细胞毒性小。本产品特异性地与支原体膜结合、通过改变支原体膜的通透性从而杀死支原体。尽管Myco-Zero™在作用期间可能会对细胞的活力和形态有一定的影响，但由于本产品不能穿过真核细胞的细胞膜，因此不会改变细胞的任何特性。支原体被清除后，细胞在后续的传代过程中能快速恢复其正常的生长和增殖状态，细胞后续的生长增殖几乎无影响。本产品对细胞的增殖测试结果见图1，Myco-Zero™在作用期间可能会抑制25-50%的细胞增殖，但是传代后的细胞生长和增殖均与正常的细胞无差异。

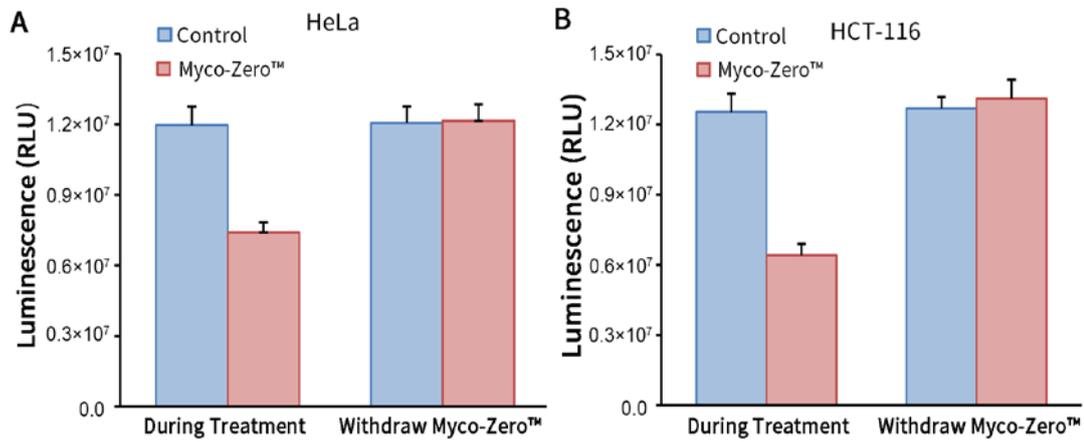


图1. 碧云天Myco-Zero™支原体去除试剂(C0280)对细胞的活力影响的检测效果图。HeLa和HCT-116细胞按照10,000/孔的密度接种于96孔板, 培养过夜后加入工作浓度的Myco-Zero™处理24小时, 用碧云天的CellTiter-Lumi™ Plus发光法细胞活力检测试剂盒(C0068)检测细胞活力, 同时按照细胞密度为10,000/孔进行传代, 培养24小时后用CellTiter-Lumi™ Plus测定细胞活性。图A为Myco-Zero™对HeLa细胞作用前后的细胞活力检测结果, 图B为Myco-Zero™对HCT-116细胞作用前后的细胞活力检测结果。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本产品为即用型无菌溶液, 使用十分便捷。**只需将本产品与细胞培养液的混合物作用于细胞即可。
- 按照每次去除支原体需要200μl Myco-Zero™的用量, 本产品的小中大包装各可以使用5次、20次和100次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0280S	Myco-Zero™支原体去除试剂	1ml
C0280M	Myco-Zero™支原体去除试剂	4ml
C0280L	Myco-Zero™支原体去除试剂	20ml
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存, 一年有效。

注意事项:

- 尽管Myco-Zero™可以彻底去除支原体, 但仍可能由于清除不彻底、后续操作、使用试剂的污染及环境等因素造成再次污染, 所以建议细胞培养期间, 每周进行一次支原体检测, 冻存细胞复苏后也尽快进行支原体检测。
- 细胞浓度是影响Myco-Zero™清除支原体效果的重要因素, 对6cm培养皿, 必须严格控制细胞量在1-10万之间。
- 在使用Myco-Zero™消除支原体前, 须确保培养液中的细胞为单个细胞, 不能成团。Myco-Zero™是通过生物物理的方法与支原体膜结合来杀灭支原体的, 因此必须直接接触支原体才能有效杀除, 细胞成团容易造成细胞间隙、成为支原体的藏身之所, 从而影响Myco-Zero™消除支原体的效果。可以通过延长胰酶的消化时间来避免细胞成团。
- 细胞培养液中脂肪和蛋白质的浓度会影响Myco-Zero™消除支原体的效果, 胎牛血清中含有胆固醇和其它Myco-Zero™的靶分子可能会阻止Myco-Zero™与支原体膜的结合, 高浓度的胎牛血清会严重影响Myco-Zero™消除支原体的效果。在清除污染细胞中的支原体时, 细胞培养液中胎牛血清的最佳浓度为5%。
- 细胞应直接加入Myco-Zero™与培养液或者PBS的混合液中, 以使细胞充分悬浮, 防止吹打细胞时造成的气溶胶粘附于培养皿或者离心管的表面, 妨碍Myco-Zero™与细胞的充分作用, 从而影响支原体清除效果。
- 当Myco-Zero™的作用时间为数天时(细胞增殖一代的时间), 期间应密切观察细胞的状态。必要时可更换成标准培养液, 或将含有Myco-Zero™的培养液用标准培养液5倍稀释后继续培养。Myco-Zero™作用期间对细胞有一定的毒性, 可以同时设置无Myco-Zero™作用的对照, 对照组细胞长满后即可同时传代。
- 经Myco-Zero™消除支原体后的细胞可能仍能检测出支原体的存在。一方面, Myco-Zero™消除支原体的过程中支原体膜溶解, 支原体的DNA会释放存在于培养液中, 引起支原体核酸检测呈假阳性, 随着细胞的继续培养、细胞外的DNA会慢慢被水解, 建议经Myco-Zero™杀除后的细胞在继续正常传代培养3到4代后再进行支原体检测; 另一方面, Myco-Zero™的去除功效会受细胞密度、细胞状态等因素的影响, 第一次去除时可能不能完全消除, 甚至会因为操作等不当造成细胞的再次污染, 此时可以待细胞状态稳定后进行第二次去除。使用碧云天生产的Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(C0297/C0298)可以避免核酸检测出现的假阳性。
- 进行病毒支原体去除前, 首先要检测待感染的宿主细胞系是否有支原体污染, 确保所用的宿主细胞无支原体污染。
- 包膜病毒(Enveloped viruses)外层的脂质膜成分与支原体膜相似, 也是Myco-Zero™结合的对象, 根据使用Myco-Zero™的浓度和作用时间, 这些病毒也极易被Myco-Zero™去除, 为了能够彻底去除支原体同时保证病毒的感染能力, 起始病毒滴度应高于10⁶ TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose)。而对于无包膜病毒(Non-enveloped viruses)支原体的去除, 病毒的滴度不会影响去除效果。

- 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。

使用说明：

1. 对贴壁细胞支原体的去除：

- 支原体污染细胞的准备：贴壁细胞消化、计数，用含有5%胎牛血清的标准培养液将细胞密度调整为5000-50000个/ml，备用。
- 在6cm培养皿中加入2.8ml含有5%胎牛血清的标准培养液。
- 加入200 μ l Myco-Zero™，混匀。
- 加入步骤1a中准备好的细胞悬液2ml，混匀。此时总体积为5ml，细胞数约为1-10万。
- 正常培养细胞至细胞密度达到80-90% (通常需要5-8天)，将细胞进行传代培养。

注：培养期间需要密切观察细胞的状态，如果发现细胞有明显的损伤，应通过更换或者稀释培养液来终止支原体清除作用；如果细胞生长比较缓慢，培养5-8天后细胞密度达不到80-90%的传代标准，也可以将细胞消化后加入标准培养液、转入新的培养皿继续培养。

2. 对悬浮细胞支原体的去除：

- 支原体污染细胞的准备：细胞计数，用含有10%胎牛血清的标准培养液将细胞密度调整为6000-60000个/ml，备用。
 - 在15ml无菌离心管中加入1.6ml含有0.125%胰酶、5mM EDTA的PBS。可以使用C0203 胰酶细胞消化液(0.25%胰酶，含酚红)用PBS稀释1倍后使用，EDTA需要额外补加至最终浓度为5mM。
 - 加入200 μ l Myco-Zero™，混匀。
 - 加入步骤2a中准备好的细胞悬液1.6ml。此时总体积为3.4ml，细胞数约为1-10万。
 - 37°C，摇床上缓慢摇动孵育30分钟。注：对于Myco-Zero™敏感的细胞，可以调整Myco-Zero™的作用时间为15到20分钟。
 - 600 \times g离心10分钟，去上清。
 - 加入含有10%胎牛血清的标准培养液重悬细胞，转入培养皿或者培养瓶进行正常培养。
- (选做)为更加彻底地去除支原体，继步骤2f后也可以按照如下步骤用Myco-Zero™进一步处理。
- 用5ml含有5%胎牛血清的标准培养液重悬细胞。
 - 加入150 μ l Myco-Zero™，混匀。
 - 加入至6cm无菌培养皿中，正常培养3天。
 - 将培养液更换成含有10%胎牛血清的标准培养液，继续正常培养。

3. 对无包膜病毒支原体的去除：

- 在1.5ml无菌离心管中加入1ml无血清的标准培养基。
 - 加入100 μ l Myco-Zero™，混匀。
 - 加入125 μ l病毒溶液(病毒溶液中的胎牛血清浓度 \leq 8%)，轻轻涡旋混匀。此时‘病毒-Myco-Zero™混合物’体积约为1.2ml。
 - 室温孵育2小时。
 - 使用细胞培养液对‘病毒-Myco-Zero™混合物’进行10倍稀释以终止Myco-Zero™的作用，如1.2ml‘病毒-Myco-Zero™混合物’中加入10.8ml细胞培养液；也可以直接将‘病毒-Myco-Zero™混合物’加入待感染的细胞中进行细胞感染，只需最终总培养液体积是‘病毒-Myco-Zero™混合物’的10倍即可。
- 注：在‘病毒-Myco-Zero™混合物’的涡旋混匀过程中，确保混合物充分润湿了离心管的整个内表面，避免局部有支原体污染区域没有被处理到。

4. 对包膜病毒支原体的去除：

- 在15ml无菌离心管中加入4.4ml无血清的标准培养基。
- 加入100 μ l Myco-Zero™，混匀。
- 加入500 μ l病毒溶液(病毒溶液中的胎牛血清浓度 \leq 8%)，轻轻涡旋混匀。此时‘病毒-Myco-Zero™混合物’体积为5ml。
- 室温孵育30分钟。
- 使用细胞培养液对‘病毒-Myco-Zero™混合物’进行10倍稀释以终止Myco-Zero™的作用，如1ml‘病毒-Myco-Zero™混合物’中加入9ml细胞培养液；也可以直接将‘病毒-Myco-Zero™混合物’加入待感染的细胞中进行细胞感染，只需要最终总培养液体积是‘病毒-Myco-Zero™混合物’的10倍即可。

注1：在‘病毒-Myco-Zero™混合物’的涡旋混匀过程中，确保混合物充分润湿了离心管的整个内表面，避免局部有支原体污染区域没有被处理到。

注2：本病毒溶液中支原体的去除过程，可多次用于病毒收获液中的支原体去除，以确保支原体已完全去除。

5. 对其它支原体污染的试剂的处理：处理方式同‘对无包膜病毒支原体的去除’。

参考文献：

- Uphoff CC, Drexler HG. Curr Protoc Mol Biol. 2014. 106:28.4.1-14.
- Fleckenstein E, Uphoff CC, Drexler HG. Leukemia. 1994. 8(8):1424-1434.
- Uphoff CC, Gignac SM, Drexler HG. J Immunol Methods. 1992. 149(1):55-62.
- Blanchard A, Montagnier L. Annu Rev Microbiol. 1994.48:687-712.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0280S	Myco-Zero™支原体去除试剂	5次
C0280M	Myco-Zero™支原体去除试剂	20次
C0280L	Myco-Zero™支原体去除试剂	100次
C0283-500ml	Myco-Zero™支原体去除喷雾	500ml
C0283-2L	Myco-Zero™支原体去除喷雾	2L
C0288S	支原体清除试剂	20mg
C0288M	支原体清除试剂	100mg
C0290S	支原体清除试剂Plus	10mg
C0290M	支原体清除试剂Plus	50mg
C0292-2ml	支原体预防去除试剂I	2ml
C0292-10ml	支原体预防去除试剂I	10ml
C0293-2ml	支原体预防去除试剂II	2ml
C0293-10ml	支原体预防去除试剂II	10ml
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
C0297S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	20次
C0297M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	100次
C0298S	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	20次
C0298M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	100次
C0299S	Myco-Lumi™发光法支原体检测阳性对照	20次
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次

Version.2022.11.01