APPLICATION NOTE

如何利用Molecular Devices多功能微孔板读板机和MycoAlert支原体检测试剂盒进行相应污染物评价

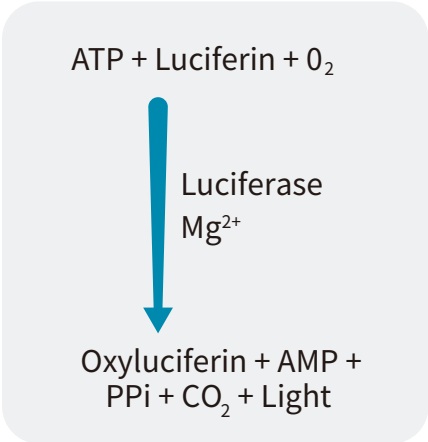
简介

支原体是目前已知最小的原核生物，是一种常见于哺乳动物细胞培养中污染源。支原体污染让细胞培养人员付出很大代价，因为它们改变了受污染细胞的形态、活力和代谢特征。通过显微镜很难在培养基中发现支原体。目前针对这种情况的污染需要一种灵敏可靠的检测方法，传统的支原体污染物检测方法如耗时标记法和繁琐的PCR等，检测结果也很难得到准确分析。

MycoAlert支原体检测试剂盒和MycoAert PLUS检测试剂盒均来自Lonza Walkersville有限公司，此试剂基于生化反应配合具有发光功能微孔板读板机来检测某种支原体酶活力。这些酶的存在提供了一种快速筛选过程，可以非常灵敏的对测试样品进行支原体污染检测。MycoAert PLUS作为下一代的检测试剂盒，较上一代标准版试剂盒具有更高光量子输出效率，化学发光读板机获得更宽的动态学范围，无论是培养基、细胞培养基上清、水均能进行相应检测。两种试剂盒的程序步骤一致。

第一步首先将MycoAlert试剂加入细胞培养上清液中，裂解支原体触发化学发光反应，如图一所示；第二步，有活力的支原体被裂解并释放出能与MycoAlert底物反应的酶，催化ADP 转化为ATP，通过检测样品中加入MycoAlert底物前后ATP的水平，可以得到其比值并指明支原体是否存在。如果这些酶不存在，那么第二次的读数将不会增加。(MycoAlert的Ratio＜0.9和MycoAert PLUS的Ratio＜1.0)，如果样品阳性的话，其第二次检测值高于第一次，Ratio＞1.2，如图二所示为检测流程。

这篇应用文章介绍了如何利用Molecular Devices公司的具有化学发光的微孔板读板机进行相应检测，仪器和试剂盒组合简单易操作，进行相应检测时表现出很高的灵敏度。两种类型的检测试剂盒均可在Molecular Devices公司推出的具有化学发光的微孔板读板机进行相应的检测实验，获得较优的结果。



图一：生物化学发光反应检测ATP含量

优势

- 灵敏、可靠的支原体检测方式
- 简单、易操作、可快速获得检测结果
- 检测结果简单、明了

材料：

- MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza cat. #LT07-318)
- MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza cat. #LT07-710)
- MycoAlert Assay Control Set (Lonza cat. #LT07-518)
- 96-well polystyrene solid white plates (Greiner cat. #655075)
- 微孔板读板机
  - » SpectraMax i3 多功能微孔板读板机
  - » SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机
  - » SpectraMax Paradigm 多功能微孔板读板机
  - » SpectraMax M5 多功能微孔板读板机
  - » FilterMax F5 多功能微孔板读板机
  - » SpectraMax L 微孔板读板机

方法

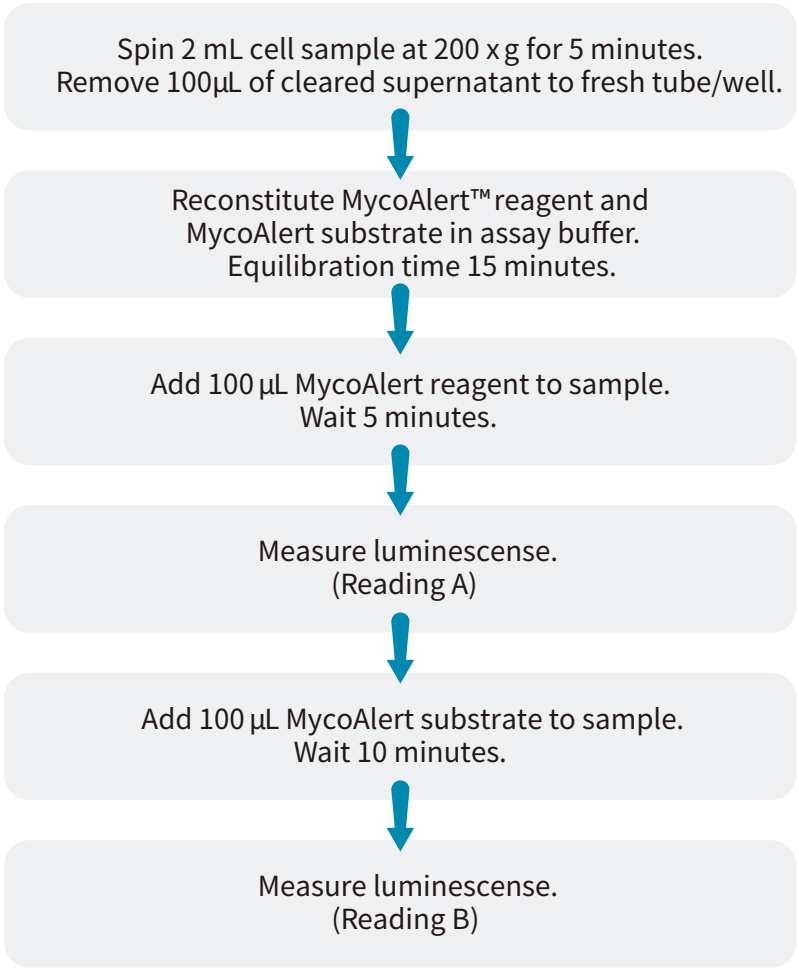
MycoAlert和MycoAlert PLUS试剂盒基本原理一致，但是其两种试剂盒检测浓度动态学范围不同，详细信息如下，每种试剂盒在使用当天进行试剂配置。

MycoAlert阳性质控样品稀释关系如表一所示，100 µL系列稀释的MycoAlert阳性质控样品加于白色96-孔发光多孔板中做3个重复。100 µL MycoAlert试剂(溶于MycoAlert缓冲液中)加于每个孔中并在室温下孵育5分钟。孔板置于发光型微孔板读板机中，使用SoftMax® Pro 软件(读数A)的读取所选孔的读数。100 µL的MycoAlert底物(溶于MycoAlert缓冲液)立即加入到每个孔中并在室温下孵育10分钟。孔板置于发光型微孔板读板机中进行检测，所选孔的读数(读数 B)。仪器设置见表二。

结果

我们利用Lonzede公司的MycoAlert试剂盒针对所有发光型微孔板读板机进行灵敏度评价，针对于MycoAlert试剂盒质控样品在1:8稀释倍数关系时获得Ratio＞1.2，而针对于MycoAlert PLUS试剂盒质控样品在1:1000稀释倍数关系时可获得Ratio＞1.2。

所有的Molecular Devices公司推出的发光功能的微孔板读板机均能获得超过预期的灵敏度，我们列举了利用SpectraMax i3x多功能微孔板读板机和两种试剂盒检测数据值，如图三所示；而表三显示所有Molecular Devices的微孔板读板机对阳性样品稀释至非常低的比率关系也可检测到Ratio＞1.2的信息情况。



图二：MycoAlert试剂盒检测流程，化学发光信号检测流程A次读值和B次读值，其中B比上A的比率值，（Ratio＞1.2）代表有污染，或者（MycoAlert的Ratio＜0.9和MycoAlert PLUS的Ratio＜1.0）代表无污染。

MycoAlert	MycoAlert PLUS
Positive control	Positive control
1:2	1:10
1:4	1:100
1:8	1:1000
1:16	1:10000
Negative control	Negative control

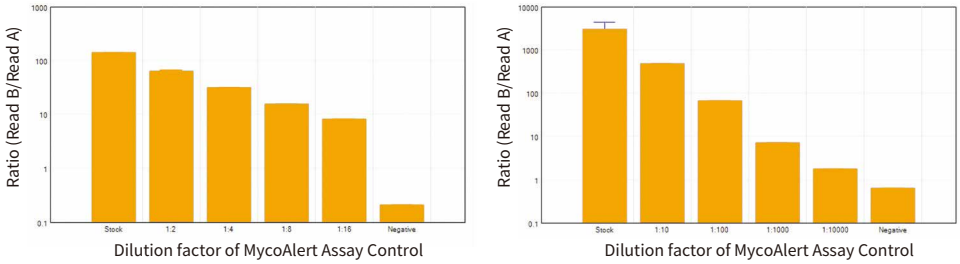
表一：准备MycoAlert和MycoAlert PLUS试剂标准品进行梯度稀释，阳性质控试剂梯度稀释与MycoAlert缓冲液中。

Parameter	Setting
Read Mode	Luminescence* (All Wavelengths)
Integration Time	1 second
Plate Type	96 Well Greiner

表二：MycoAlert检测时仪器设置方式。

结论

结果显示所有Molecular Devices公司具有发光功能的微孔板读板机均能够满足此试剂盒的检测要求，并获得灵敏的检测结果；Molecular Devices微孔板读板机结合MycoAlert试剂盒，能够灵敏、迅速的检测支原体含量，确保及时检测到污染物，节省后期实验的宝贵时间。



图三：使用SpectraMax i3x 对阳性质控样品梯度稀释后获得的检测结果，其中阴性样品仅包括MycoAlert缓冲液，每种试剂盒，微孔板读板机均能检测阳性质控样品低稀释度信号。
左侧图为MycoAlert试剂盒，右侧图为MycoAlert PLUS试剂盒。

Microplate Reader	MycoAlert Ratio (1:8 assay control)	MycoAlert PLUS Ratio (1:1000 assay control)
SpectraMax i3x	15.8	7.4
SpectraMax M5	17.8	5.7
SpectraMax Paradigm	7.8	5.2
FilterMax F5	9.8	2.9
SpectraMax L	9.8	9.0

表三： 不同读板机在阳性质控低稀释关系可获得Ratio＞1.2情况。

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司
全国咨询服务热线: 400-820-3586 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
上海 电话: 86-21-3372 1088 传真: 86-21-3372 1066 地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
北京 电话: 86-10-6410 8669 传真: 86-10-6410 8601 地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
成都 电话: 86-28-6558 8820 传真: 86-28-6558 8831 地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
台北 电话: 886-2-2656 7585 传真: 886-2-2894 8267 地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港 传真: 852-2289 5385 地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼