

关于支原体污染

支原体检测

支原体污染是细胞培养过程中的常见污染, 本Protocol的信息源自庞南姐并加以整理

1. 取1 mL细胞培养液(传代前不含有细胞的上清液即可), 13000 g离心5 min, 弃上清
2. 用1 mL PBS(细胞间用)重悬, 13000 g离心5 min, 弃上清
3. 沉淀加200 μ L PBS(细胞间用)重悬, 90°C 金属浴15 min
4. PCR反应体系(20 μ L M5 Taq检测酶体系)

每次实验需使用之前的检测样品作为阳性对照, 以及空培养基和空PBS作为阴性对照

体系	用量
2xM5 Taq(检验酶)	10 μ L
样品	5 μ L
mycoplasma_F(10 μ M)	0.6 μ L
mycoplasma_R(10 μ M)	0.6 μ L
ddH ₂ O	3.8 μ L

PS: 针对支原体16S rRNA序列保守区域设计特异引物如下

- mycoplasma_F: GGGAG CAAAC AGGAT TAGAT ACCCT
- mycoplasma_R: TGCAC CATCT GTCAC TCTGT TAACC TC

5. PCR条件: 94°C 2min, 94°C 30s变性, 55°C 30s复性, 72°C 20s延伸, 72°C 7min
6. 配制 2%琼脂糖凝胶, 中孔梳子, 100 bp DNA Marker, 20 μ L全部上样(阳性条带在200 300 bp)

支原体清除

实验室使用北京金式金的支原体清除试剂盒, 其提供了大环内酯类抗生素TransMyco-1、四环素类衍生物TransMyco-2, 氟喹诺酮类广谱抗生素TransMyco-3。其中, 1和2可以有效干扰支原体的蛋白表达, 3可以有效干扰支原体的DNA复制。1和2按先后顺序联合使用, 或持续使用3, 处理两周便能很好地去除支原体污染。

TransSafe™ Mycoplasma Elimination Reagent (TransMyco-1/2/3)

1. 换液前取1 mL细胞培养液作为清除前的样品, 制样后可保存于-20°C冰箱
2. 准备培养基(每次现配现用), 如下为一个样品的用量:

不含双抗 培养基(6 mL) + 5%血清(300 μ L) + Myco-1/2/3抗生素(100x使用, 63 μ L)

PS: 抗生素是500 μ L分装, 保存于细胞间-20°C冰箱中, 避免反复冻融, 4°C可保存1周

3. 对细胞做正常传代, 但细胞留得稀一点(100 μ L左右, 4-5滴胰酶消化液即可), 使用含Myco-1/2/3的培养基培养细胞3天
4. 支原体的清除可以有两种策略:
 - 一种是依次循环使用Myco-1和Myco-2, 每种药培养细胞3-4天
 - 另一种是持续使用Myco-3, 每隔3天传代一次
5. 一周后、两周后、三周后检测, 直至支原体被清除后一周, 确保支原体被彻底清除

修订日期 2023-10-08

JW Wang L5