



支原体检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司	ETC811
ND-1000 分光光度仪	NanoDrop 公司	ND-1000

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
支原体 PCR 检测试剂盒	碧云天	C0301S
TRIzol™ Reagent	赛默飞	15596026CN
氯仿	默克	C2432



DEPC 水	赛默飞	750023
dsDNase	安徽科兔生物科技有限公司	KR511

二、实验步骤

1、**样本准备**：取待检测细胞的培养上清作为检测样本。检测前应保证细胞处于正常培养状态，培养时间一般不少于 48 h，且近期末更换含抗生素浓度较高的培养基。若细胞刚复苏或刚传代，建议待细胞状态稳定后再进行检测。

2、**样本收集**：在无菌条件下收集细胞培养上清，转移至无菌离心管中。若培养液中漂浮细胞或碎片较多，可进行低速离心，取上清用于后续检测。样本应尽量新鲜检测，如不能立即检测，应按试剂盒说明书要求短期保存，避免反复冻融。

3、**检测方法选择**：根据实验室条件选择合适的支原体检测方法。常用方法包括：

PCR 法：通过扩增支原体特异性核酸片段判断是否污染。

4、**PCR 检测**：按照支原体检测试剂盒说明书配置反应体系。一般设置待测样本、阳性对照、阴性对照和空白对照。将细胞培养上清或经处理后的样本加入反应体系中，进行 PCR 扩增检测。检测完成后，根据电泳条带结果判断样本是否存在支原体污染。

5、**荧光染色检测**：将待检测细胞接种于细胞爬片或培养板中，待细胞贴壁后进行固定和 DNA 荧光染色。染色完成后，在荧光显微镜下观察细胞核及细胞周围背景信号。

若细胞核染色清晰，细胞周围背景干净，通常提示未见明显支原体污染；若细胞周围或细胞间隙可见大量细小点状荧光颗粒，应考虑支原体污染可能。

6、**快速检测试剂盒检测**：按试剂盒说明书取适量细胞培养上清，与检测试剂混合孵育。检测反应信号，如发光值、颜色变化或其他读数。根据说明书提供的判断标准，比较待测样本与阴性、阳性对照结果，判断是否存在支原体污染。

7、**结果记录**：记录检测细胞名称、细胞批次、传代次数、检测日期、检测方法、样本来源、对照设置及检测结果。若检测为阳性，应及时标记污染细胞，并记录后续处理措施。

三、结果判读：

1、**阳性结果**：若 PCR 检测中待测样本无特异性扩增，或 Ct 值未达到阳性判定标准，同时阴性对照和空白对照无异常信号，阳性对照结果正常，则可判定该样本未检出支原体污染。

四、注意事项：

1、**不建议长期依赖抗生素掩盖污染**：常规青链霉素不能有效清除支原体污染，长期使用抗



生素还可能影响检测结果和细胞状态。若怀疑支原体污染，应尽快检测，而不是单纯加抗生素处理。

2、**样本采集要规范：**取样时应避免吸入细胞碎片、沉淀物或其他污染物。不同细胞样本应使用独立枪头和离心管，避免交叉污染。

3、**必须设置对照：**支原体检测应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。没有对照的检测结果可信度较低，尤其是 PCR/qPCR 法，容易因污染或抑制导致假阳性或假阴性。