

## Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂

| 产品编号   | 产品名称                   | 包装    |
|--------|------------------------|-------|
| C0285S | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂 | 50次   |
| C0285M | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂 | 250次  |
| C0285L | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂 | 1000次 |

### 产品简介:

- 碧云天生产的Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂，英文名称为Myco-Zero™ Plus Mycoplasma Removal Agent (MRA)或Myco-Zero™ Plus Mycoplasma Elimination Reagent，简称Myco-Zero™ Plus，是一种用于快速、高效、便捷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。本产品是Myco-Zero™支原体去除试剂(C0280)的升级产品，使用更便捷。
- 本产品的用途与碧云天Myco-Zero™支原体去除试剂(C0280)和Minerva Biolabs公司的Mynox®基本相同，对支原体的最终去除效果基本一致，但是本产品的使用更加便捷，细胞和去除试剂无需任何预处理，细胞正常培养和传代，只需将细胞培养液换成含有本产品的培养液，使用1-3次、作用2-5天即可有效去除支原体。
- 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™ Plus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。清除支原体后撤去Myco-Zero™ Plus，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、悬浮细胞MOLM-13的支原体去除效果参见图1，经碧云天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™ Plus作用2次后，支原体再次检测结果为阴性，转阴后细胞状态很稳定，撤去Myco-Zero™ Plus后继续培养，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，图中数据仅供参考。

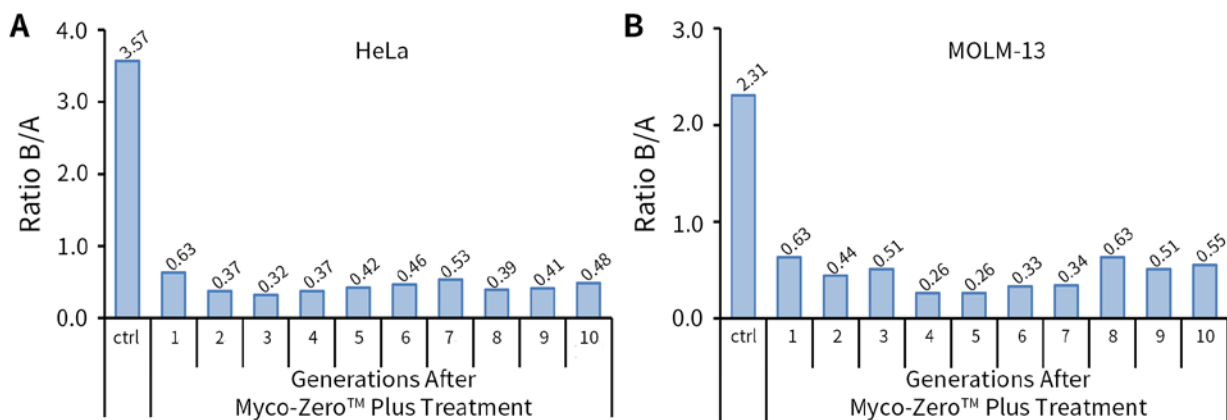


图1. 碧云天Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂(C0285)对支原体阳性细胞的作用效果。图A为对贴壁的HeLa细胞的支原体去除效果，图B为对悬浮的MOLM-13细胞的支原体去除效果。本产品作用支原体阳性细胞两次后，支原体转阴的状态很稳定。注1：图中的1、2等数字代表细胞经Myco-Zero™ Plus处理2次后的传代次数。注2：碧云天的Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用) (C0297)通过计算读值B与A的比值来判断是否有支原体污染。如果比值大于1.2表示有支原体污染，比值越大说明污染程度越高，如果比值小于0.9说明没有支原体污染，如果比值介于0.9和1.2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。实际读数会因细胞种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **本产品作用迅速、效果稳定。**本产品仅需使用1-3次、作用2-5天即可几乎永久有效地消除培养细胞中的支原体，比其它支原体去除试剂更加高效快捷。本产品与碧云天的4款抗生素类支原体清除试剂(C0288)、支原体清除试剂Plus (C0290)、支原体预防去除试剂I (C0292)、支原体预防去除试剂II (C0293)对被支原体污染的贴壁细胞HeLa、悬浮细胞MOLM-13的支原体去除效果比较参见图2。对于贴壁的HeLa细胞，在5种支原体去除试剂作用过程中支原体检测结果均呈阴性，作用两次后撤去清除试剂进行传代培养，Myco-Zero™ Plus处理的细胞保持阴性，而抗生素类清除或去除试剂处理的细胞在传代过程中很快复阳；对于悬浮的MOLM-13细胞，Myco-Zero™ Plus作用2次过程中支原体均呈阴性，而抗生素类清除或去除试剂处理后支原体感染情况有所好转但仍呈阳性。抗生素类清除或去除试剂的自身特点是需要更多的作用次数、更久的作用时间才能清除或抑制支原体，且需要长期维持，而本产品仅需处理1-3次，且转阴后即可撤去，无须长期维持。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，图中数据仅供参考。

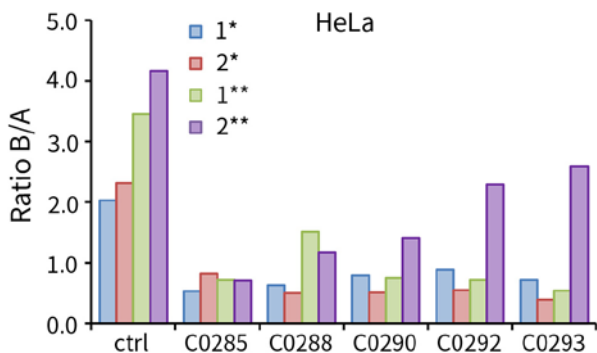


图2. 碧云天Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂(C0285)与抗生素类支原体清除试剂(C0288)、支原体清除试剂Plus (C0290)、支原体预防去除试剂I (C0292)、支原体预防去除试剂II (C0293)对支原体阳性的HeLa细胞去除支原体的效果图。本产品与抗生素类同类产品对贴壁的阳性HeLa细胞支原体去除效果对比图，5种支原体去除试剂作用过程中支原体检测结果均呈阴性，作用两次后撤去清除试剂进行传代培养，Myco-Zero™ Plus处理的细胞保持阴性，而抗生素类清除或去除试剂处理的细胞在传代过程中很快复阳；注：图中1\*、2\*数字代表细胞经各支原体去除试剂的处理次数，1\*\*、2\*\*数字代表细胞经各支原体去除试剂处理2次后的传代次数。支原体检测方法同图1。实际读数会因细胞种类、感染的支原体种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **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™ Plus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。
- **本产品为即用型无菌溶液，使用十分便捷。**只需将细胞培养液换成含有本产品的培养液即可，无须降低血清浓度。
- 按照1000倍的稀释比例，本产品的小中大包装各可以配制细胞培养液100、500和2000ml。按照10cm培养皿每次需要10ml培养液计算，本产品的小中大包装各可以使用10次、50次和200次；按照6孔板每孔使用2ml培养液计算，本产品的小中大包装各可以使用50次、250次和1000次。

#### 包装清单：

| 产品编号   | 产品名称                          | 包装    |
|--------|-------------------------------|-------|
| C0285S | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂(1000X) | 0.1ml |
| C0285M | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂(1000X) | 0.5ml |
| C0285L | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂(1000X) | 2ml   |
| —      | 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™ Plus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。
- Myco-Zero™ Plus是通过生物物理的方法与支原体膜结合来杀灭支原体的，必须直接接触支原体才能有效杀除，因此作用于悬浮细胞时只需更换含有本产品的细胞培养液即可。对于贴壁细胞，建议在对细胞进行消化和传代处理即细胞处于悬浮状态时就加入本产品，这种方式下支原体的去除效果比细胞贴壁后再加入更好，对细胞的状态影响也更小。
- Myco-Zero™ Plus在作用过程中可能会对细胞的活力和形态产生一定的影响，为使细胞后续正常生长，需保证一定的细胞数量，例如贴壁细胞密度在60%以上为宜。以6cm培养皿为例，悬浮细胞的数量在30万个以上为佳，但是细胞量也不宜过大，否则可能会降低本产品的效果。不同细胞对本产品的耐受程度有所差异，可以根据结果适当调整细胞量。作用期间应密切观察细胞的状

态, 如果出现细胞变形、生长缓慢等现象, 可以更换成标准培养液终止作用, 或者将Myco-Zero™ Plus去除试剂按照1:1500甚至更高的稀释倍数稀释后使用, 但降低使用浓度后的作用次数和作用时间可能需要增加和延长。

- 支原体检测阳性的细胞转阴时间与细胞种类、细胞状态、及支原体种类、支原体污染严重程度等密切相关, 经Myco-Zero™ Plus处理后转阴的细胞, 建议再巩固作用一次, 以彻底的清除支原体、防止复阳。例如我们实测悬浮细胞MOLM-13, 仅需处理一次、作用两天, 细胞即可转阴、且转阴后的状态非常稳定, 而HeLa细胞在处理一次后也转阴, 但是传代后可能会复阳, 处理两次后转阴的状态则很稳定。
- 经Myco-Zero™ Plus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™ Plus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™ Plus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™ Plus的去除功效会受细胞密度、细胞状态等很多因素的影响, 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™ Plus结合的对象, 根据使用Myco-Zero™ Plus的浓度和作用时间, 这些病毒也极易被Myco-Zero™ Plus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 $10^6$  TCID<sub>50</sub> (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. Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液的准备:

对于细胞样品, 根据所需细胞培养液量, 将本产品和新鲜细胞培养液按1:1000的比例混匀, 例如取10 $\mu$ l本产品加入10ml新鲜的细胞标准培养液(标准培养液中含10%血清也是可以的), 混匀即得10ml Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液。注: Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液需现配现用, 不可保存后使用。对于病毒样品, 使用无血清细胞培养液配制去除工作液, 稀释比例也有所不同, 具体参见如下相关步骤。

### 2. 对贴壁细胞支原体的去除:

- a. Day 1: 消化贴壁细胞, 计数确定细胞量, 加入适量Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液, 正常条件接种培养。注: 细胞量以贴壁第二天细胞能铺满培养皿或培养瓶底60%以上为宜。
- b. Day 3: 用Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液进行换液或者再次进行传代处理。  
注1: 如果细胞达到传代的密度, 则进行第二次传代处理; 如果细胞生长较缓慢, 不宜传代, 则更换新鲜的Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液继续处理; 若细胞的形态受到了影响, 则适当加大Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂的稀释比例继续作用。  
注2: 一般情况下, 连续处理两次即可成功清除支原体, 可以根据支原体污染的严重程度及细胞的状态调整处理次数和作用时间。
- c. 取细胞培养上清, 使用Myco-Lumi™ 发光法支原体检测试剂盒(C0297/C0298)或其它支原体检测方法检测支原体是否彻底清除。
- d. 支原体彻底清除后, 更换成标准细胞培养液培养细胞。Myco-Zero™ Plus无须长期维持。

### 3. 对悬浮细胞支原体的去除:

- a. Day 1: 将培养的悬浮细胞转移至离心管, 1000 $\times$ g离心5分钟, 去上清, 用适量Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液重悬细胞。计数确定细胞量, 加入适量Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液, 正常条件接种培养。
- b. Day 3: 用Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液进行换液。  
注: 一般情况下, 连续处理两次即可成功清除支原体, 用户可以根据支原体污染的严重程度及细胞的状态调整处理次数和作用时间。
- c. 取细胞培养上清, 使用Myco-Lumi™ 发光法支原体检测试剂盒(C0297/C0298)或其它支原体检测方法检测支原体是否彻底清除。
- d. 支原体彻底清除后, 更换成标准细胞培养液培养细胞。Myco-Zero™ Plus无须长期维持。

### 4. 对无包膜病毒支原体的去除:

- a. 配制Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液时, 使用无血清细胞培养液, 稀释比例为1:800。例如取12.5 $\mu$ l本产品加入10ml无血清细胞培养液, 混匀即得10ml Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液。
- b. 将病毒溶液和Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液按1:10的比例, 轻轻涡旋混匀。例如100 $\mu$ l病毒溶液加入1ml Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液。此时‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’体积约为1.1ml。注: 病毒溶液中的胎牛血清浓度越少, 支原体去除效果越好。
- c. 室温孵育2小时。
- d. 使用细胞培养液对‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’进行10倍稀释以终止Myco-Zero™ Plus的作用, 如1.1ml‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’中加入9.9ml细胞培养液; 也可以直接将‘病毒-Myco-Zero™ Plus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™ Plus混合物’的10倍即可。

注：在‘病毒-Myco-Zero™ Plus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。

#### 5. 对包膜病毒支原体的去除：

- 配制Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液时，使用无血清细胞培养液，稀释比例为1:4000。例如取2.5μl本产品加入10ml无血清细胞培养液，混匀即得10ml Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液。
- 将病毒溶液和Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液按1:10的比例，轻轻涡旋混匀。例如100μl病毒溶液加入1ml Myco-Zero™ Plus支原体去除工作液。此时‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’体积约为1.1ml。注：病毒溶液中的胎牛血清浓度越少，支原体去除效果越好。
- 室温孵育30分钟。
- 使用细胞培养液对‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’进行10倍稀释以终止Myco-Zero™ Plus的作用，如1.1ml‘病毒-Myco-Zero™ Plus混合物’中加入9.9ml细胞培养液；也可以直接将‘病毒-Myco-Zero™ Plus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™ Plus混合物’的10倍即可。

注1：在‘病毒-Myco-Zero™ Plus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。

#### 6. 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    |
| C0285S      | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂         | 50次   |
| C0285M      | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂         | 250次  |
| C0285L      | Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂         | 1000次 |
| 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 2023.02.23