

细胞培养污染检测试剂盒

产品编号: MA0343 规格: 20T

产品内容

产品组成	MA0343
Calcofluor White M2R	10 μ l
Mycolight Green JJ98	10 μ l
WGA-iFluor 594	50 μ l
说明书	1 份

产品简介

细胞培养污染检测试剂盒提供一种在细胞培养过程中简单有效的进行微生物污染检测的方法。细胞培养污染检测试剂盒不仅用于检测是否存在污染物，同时还可以鉴别污染物类型，包括酵母（和其他真菌）、革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。

使用本试剂盒时，需要将样品进行两个载玻片的染色：一个载玻片上用 **Calcofluor White M2R** 染色，它是一种可被紫外激发的、特异性结合真菌细胞壁的蓝色荧光染料。另一个载玻片是用 **Mycolight Green JJ98** 和 **Wheat Germ Agglutinin(WGA)-iFluor 594** 染色，**JJ98** 是一种绿色荧光核酸染料；**WGA** 是一种麦胚凝集素，可以结合 **N-乙酰葡萄糖胺** 和 **N-乙酰神经氨酸残基**。由于 **N-乙酰葡萄糖胺** 在革兰氏阳性菌中的丰度和可获得性通常大于革兰氏阴性菌，所以 **WGA** 的荧光偶联物可作为革兰氏阳性菌的探针。因此，第二个载玻片可鉴别出革兰氏阳性和阴性菌。革兰氏阳性菌可被同时染上红色和绿色荧光，革兰氏阴性菌只呈现绿色荧光。

本试剂盒具有以下特点：

1. 可在一小时内通过荧光染色判断培养细胞是否存在微生物污染。
2. 可直接鉴定出所染菌的大致种类，从而为下一步制定解决方案提供依据。
3. 染色液为溶液形式，无需溶解，可直接进行工作液的配制。
4. 染色清晰，荧光明亮，灵敏度高，结果更加准确。

保存和运输条件

-20℃避光保存，有效期 12 个月。冰袋运输。

使用说明

一、试剂和工作液的准备：

1. BSA-生理盐水溶液：将 250mg BSA 和 0.88g NaCl 溶解于 100ml 蒸馏水中，过滤除菌，配制成含有 0.25% BSA 和 0.15M NaCl 的 BSA-生理盐水溶液。（本试剂盒不提供，请自行配制）
2. WGA-iFluor 594 工作液：2.5 μ l WGA-iFluor 594+47.5 μ l BSA-生理盐水溶液。
3. MycoLight Green JJ98 工作液：0.5 μ l MycoLight Green JJ98+9.5 μ l 蒸馏水。
4. Calcofluor White M2R 工作液：0.5 μ l Calcofluor White M2R+9.5 μ l 蒸馏水。

【注】工作液可在室温下稳定数小时。

二、样品的准备：

1. 取 5ml 细胞培养物样本，将其转移到 15ml 无菌离心管中。对于贴壁细胞，只吸取培养基上清；对于悬浮细胞，需要将细胞和培养基一起收集。
2. 1000 \times g 离心 15 分钟。
3. 小心弃掉上清，用 200 μ l BSA-生理盐水溶液重悬。

【注】可先用 1ml BSA-生理盐水溶液重悬进行洗涤，离心后再用 200 μ l BSA-生理盐水溶液重悬，这样可洗掉培养基中核酸和其他成分，减少染料的非特异结合。

4. 分别将 20 μ l 样品滴加在两个用乙醇或甲醇预清洗的载玻片上，分别标记“B”和“Y”，“B”用于细菌检测，“Y”用于真菌检测。

【注】建议用 PAP PAN 或其他免疫组化笔在载玻片上画圈，以限制液滴。

5. 将滴加有样品的载玻片置于 37 $^{\circ}$ C 下干燥约 10 分钟。然后样品面朝上，快速过火焰三次，进行固定。

【注】注意不要过热，每过一次火焰可用手背感受温度，控制在皮肤可忍受的温度。

6. 将 10 μ l 稀释后的 Calcofluor White M2R 工作液滴加于载玻片 Y 的干燥样品上，使其均匀覆盖。小心覆盖盖玻片，避免产生气泡，避光保存。

【注】覆盖盖玻片后可用石蜡封边。

7. 将 50 μ l BSA-生理盐水溶液滴加于载玻片 B 的干燥样品上，使其均匀覆盖。静置 5 分钟，小心吸弃液体。

8. 将 50 μ l 稀释后的 WGA-iFluor 594 工作液滴加于上述载玻片 B 的样品上，使其均匀覆盖。静置 5 分钟，小心吸弃液体。

9. 将 10 μ l 稀释后的 MycoLight Green JJ98 工作液滴加于上述载玻片 B 的样品上，使其均匀覆盖。小心覆盖盖玻片，避免产生气泡，避光保存。

【注】为减少绿色荧光背景，可先用 BSA-生理盐水溶液洗去工作液，然后再覆盖盖玻片。覆盖盖玻片后可用石蜡封边。

三、荧光显微镜观察：

1. 需用 400 倍或 1000 倍（需使用油镜）放大进行观察。
2. 为了观察真菌染色情况（载玻片 Y），可根据下表激发和发射波长选择合适通道进行蓝色荧光的显微镜观察。酵母菌可被染上明亮的蓝色荧光，呈圆形或椭圆形，常有出芽；丝状真菌也可呈现丝状蓝色荧光。相比之下，细菌几乎不被染色。
3. 为了观察细菌染色情况（载玻片 B），首先根据下表激发和发射波长选择合适通道进行绿色荧光的显微镜观察，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均会呈现明亮的绿色荧光。（形态不规则的绿色荧光染色物可能是灰尘或细胞碎片。）然后根据下表激发和发射波长选择合适通道进行红色荧光的显微镜观察，革兰氏阳性菌可呈现明亮的红色荧光，而革兰氏阴性菌几乎不被染色。

【注】真菌也会染上绿色或红色荧光，但是很容易通过它们的形态和大小差异区分出来。

荧光染料	Calcofluor White M2R	MycoLight Green JJ98	WGA-iFluor 594
Ex (nm)	365	482	588
Em (nm)	435	512	604
荧光颜色	蓝色	绿色	红色
推荐滤光片	DAPI	FITC	Cy3/TRITC

注意事项

1. 管中液体体积较小，请于每次吸取前先瞬离，减少液体损失。
2. 为保持更好的检测效果，WGA-iFluor 594 建议 2.5 μ l/管分装后保存，所有染料工作液现用现配。
3. 荧光染料都存在淬灭的问题，建议在检测过程中注意避光，染色后尽量当天完成检测。
4. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。