

支原体检测试剂盒（荧光法）

产品编号：MA0344 规格：100T

产品内容

产品组成	MA0344
Hoechst 33258 染色液	10ml
固定液	100ml
抗荧光淬灭封片剂	10ml
说明书	1 份

产品简介

培养细胞中的细菌、真菌污染都在光学显微镜下可见，但支原体污染在光学显微镜下不可见，必须通过特定的检测方法进行检测。检测支原体的方法中荧光染色法为《中华人民共和国药典 2020 版四部通则 3301》中的方法，可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染。

支原体检测试剂盒(荧光法)(Mycoplasma Stain Assay Kit, Fluorescence method)是利用荧光染料(bisbenzimidazole, Hoechst 33258)来检测培养细胞中是否存在支原体污染。Hoechst 33258 会结合到 DNA 的 A-T 富集区域，而支原体的 DNA 中 A-T 含量高(55%~80%)，所以可被染色而被检测到。被支原体污染的细胞经染色后在细胞周围可看到许多大小均一的荧光小点，即为支原体的 DNA 染色斑。Hoechst 33258 和双链 DNA 结合后，最大激发波长为 352nm，最大发射波长为 461nm。

本试剂盒如用于六孔板样品检测，至少可以检测 100 个样品。

使用说明

1. 细胞样品的准备：

- 对于贴壁细胞，在六孔板或其它多孔板内或盖玻片上接种待检细胞，接种密度 $1-2 \times 10^4/\text{ml}$ 。同时可接种正常无支原体污染的同种细胞，作为阴性对照。细胞培养 3-5 天，至 50%-80%汇合度。（细胞培养过满会导致很难判断是否存在支原体污染）
- 对于悬浮细胞，培养 3-5 天后，1500rpm，5min 离心沉淀细胞，取少量细胞做细胞涂片，空气中充分晾干。

2. 加适量固定液固定细胞 10-20 分钟。

对于六孔板的一个孔，加入 1ml 固定液。确保固定液充分覆盖样品，固定前切勿对细胞进行洗涤。对于贴壁细胞，固定前需去除培养液。

3. 用无菌 PBS 按照 1:10 稀释 Hoechst 33258 染色液（1 体积 Hoechst 33258 染色液加入 9 体积无菌 PBS）。稀释后的 Hoechst 33258 染色液宜在 24 小时内使用。

4. 去除固定液，空气中晾干。

5. 加适量 10 倍稀释的 Hoechst 33258 染色液室温避光染色 10-30 分钟。

对于六孔板的一个孔，加入 1ml 染色液。确保染色液充分覆盖样品，染色时注意避光。可以用铝箔纸覆盖避光。

6. 去除染色液，无菌水洗涤三次，空气中晾干。

7. 滴加抗荧光淬灭封片剂，封片后荧光显微镜下用紫外激发光激发，观察蓝色荧光。

8. 结果判断：荧光显微镜观察时需 400 倍或 1000 倍放大观察（需使用油镜）。

支原体阴性：没有支原体污染或其它原核生物污染的细胞样品，仅观察到细胞核呈蓝绿色荧光，线粒体 DNA 不会被染色。

支原体阳性：有支原体污染的细胞样品可以观察到细胞核周围也存在大小均一的蓝绿色荧光。支原体污染严重的细胞可以观察到细胞核周围大量微粒状或丝状蓝色荧光。

细菌、真菌污染：虽然细胞核周围也会呈阳性样荧光，但细菌、真菌污染在光学显微镜下也可以观察到，而支原体观察不到，由此可以初步区分是支原体还是其它微生物。如有必要进一步鉴定，可以通过培养法或 RT-PCR 等其他方法进行进一步检测。

保存和运输条件

2-8℃ 保存，其中 Hoechst 33258 染色液需 -20℃ 避光保存，有效期 12 个月。冰袋运输。

注意事项

1. Hoechst 33258 染色试剂对人体有害，固定液有刺激性气味，请注意适当防护。
2. 检测支原体前最好用不含抗生素的培养基培养 2-3 代，这样更容易检测出支原体，因为一些抗生素可以抑制支原体生长。
3. 检测培养基或其他试剂是否存在支原体污染时，可以使用 Vero 细胞作为指示细胞，即将待检样品接种于 Vero 细胞进行检测，以提高检测灵敏度。
4. 荧光染料都存在淬灭的问题，建议染色后尽量当天完成检测。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。