版本：A4　　修改日期：2022.03.04

支原体染色检测试剂盒

产品简介：

培养细胞中的细菌污染、酵母污染或霉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。检测支原体污染的方法有很多种，包括支原体分离培养、支原体特异酶检测、RT-PCR 检测以及 DNA 荧光染色检测。上述检测方法中，除 DNA 荧光染色检测外操作步骤相对比较烦琐并且所需时间较长。

Leagene 支原体染色检测试剂盒(Mycoplasma Stain Assay Kit)是经典的利用 DNA 荧光染色法在培养细胞中原位染色检测支原体或其它原核生物的试剂盒，主要用于检测培养细胞中是否存在支原体污染。其原理是利用荧光染料（bisbenzimide，Hoechst 33258）检测支原体污染。这种染料会结合到 DNA 的 A-T 富集区域，因为支原体的 DNA 中 A-T 含量高（55%～80%），所以可将其染色而被检测到。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蓝色荧光小点，即为支原体的 DNA 染色斑，说明有支原体污染。Hoechst 33258 的最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm；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。本试剂盒的荧光染色可快速、有效、高灵敏度地检测支原体污染。该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	DA0140 100T	Storage
试剂(A): Hoechst 固定液	50ml	RT
试剂(B): Hoechst 染色液	50ml	-20℃ 避光
试剂(C): 荧光封片剂	5ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、PBS 或生理盐水、预冷的 70%乙醇或 4%多聚甲醛

2、可观察蓝光的荧光显微镜或激光共聚焦显微镜、载玻片、盖玻片

操作步骤(仅供参考)：

(一)贴壁细胞

1、取洁净盖玻片在 70%乙醇中浸泡 5 分钟或更长时间，无菌超净台内吹干或用无菌的 PBS 或生理盐水洗涤 3 次，再用细胞培养液洗涤 1 次；将盖玻片置于 6 孔板或其他培养皿内，

www.leagene.com

接种细胞培养至 50%～80%。

2、吸尽培养液，加入 Hoechst 固定液 0.5ml，固定 10 分钟或更长时间(可 4℃过夜)。

3、去除固定液，用 PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，吸尽液体，洗涤时宜用摇床或手动晃动。

4、加入 Hoechst 染色液 0.5~1ml 避光孵育 10~30min，也可用摇床或手动晃动数次。

5、弃染色液，PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，吸尽液体，洗涤时宜用摇床或手动晃动。

6、滴荧光封片剂于载玻片上，盖上贴有细胞的盖玻片，让细胞接触封片剂，避免气泡。

7、最大激发波长为 350nm，最大发射波长为 460nm，用荧光显微镜观察细胞膜或细胞周围是否有蓝色荧光小点或串珠状荧光小点。

(二)悬浮细胞

1、离心收集细胞样品于 1.5ml 离心管内并弃液，加入 Hoechst 固定液 0.5ml，缓缓悬起细胞，固定 10min 或更长时间(亦可 4℃过夜)。

2、低速离心去除固定液，用 PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，洗涤时手动晃动数次。

3、低速离心后吸去大部分液体保留约 50μl 液体，再缓缓悬起细胞，滴加至载玻片上，尽量使细胞分布均匀。

4、稍晾干，使细胞贴在载玻片上不易随液体流动。

5、均匀滴上 Hoechst 染色液 0.2~0.5ml 避光孵育 10~30 分钟，用吸水纸从边缘吸去液体，微晾干。

6、弃染色液，用 PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，吸尽液体，洗涤时宜用摇床手动。

7、滴荧光封片剂于载玻片上，盖上盖玻片，尽量避免气泡。荧光显微镜观察。

(三)组织切片

1、常规包埋切片，用 PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，洗涤时手动晃动数次。

2、均匀滴上 Hoechst 染色液 0.2~0.5ml，避光孵育 10~30 分钟。

3、弃染色液，PBS 或生理盐水洗 2 次，每次 3min，吸尽液体，洗涤时宜用摇床或手动。

4、滴荧光封片剂于载玻片上，盖上盖玻片，尽量避免气泡。荧光显微镜观察。

结果：

阴性：仅见细胞的细胞核呈现蓝色或黄绿色荧光。

阳性：除细胞外，细胞膜或细胞周围可见大小不等、不规则的荧光着色颗粒。

当阴性结果与阳性结果均成立时，结果有效。

注意事项：

1、荧光染料都存在淬灭的问题，建议染色后尽快检测，使用荧光封片剂时也应避光操作。

www.leagene.com

2、 在为了获得细胞沉淀的离心的过程中，对于特殊细胞，如果细胞沉淀不充分，可以适当提高离心力或延长离心时间。

3、 Hoechst 染色液对人体有一定刺激性，请注意适当防护。

4、 Hoechst 染色液避免反复冻融，否则容易失效。

5、 固定液有刺激性气味，建议在通风橱进行固定。

6、 检测支原体前最好用不含抗生素的培养液培养 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。

7、 本试剂盒用于 6 孔板检测时，可以进行 50 次检测反应。悬浮细胞及组织切片均可以进行 100~150 次检测反应。

8、 检测支原体污染，可以使用支原体高效 Vero 细胞，这样可以提高检测灵敏度，即将被检测样品

9、 接种于 Vero 细胞进行检测。

10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12 个月有效；4℃保存, 1 个月有效。

相关产品：

产品编号	产品名称
CC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
DA0020	Hoechst33342/PI 细胞凋亡染色试剂盒
DA0023	碘化丙啶 PI 染色液(50ug/ml,含 RNase)
DA0065	台盼蓝染色液(0.4%)
DG0005	糖原 PAS 染色液
PE0018	SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)

www.leagene.com