

支原体染色检测试剂盒

货号: PMK0518

保存: 4℃

规格: 100T

保质期: 1年。

产品描述:

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。

普美生物的支原体染色检测试剂盒是经典的利用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Hoechst33258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。Hoechst33258的最大激发波长为346nm,最大发射波长为460nm;Hoechst33258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。

产品组成:

名称	规格	保存条件
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

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:

(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,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15ml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50 μ l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。
- 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。
- 9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 10、该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

相关产品:

本试剂盒不包含以下支原体清除试剂，可以购买指定产品或者替代产品进行支原体的清除。

PM 支原体清除剂 (PMK0517)

PM 支原体预防剂 (PMK0519)