

## 支原体检测试剂盒(荧光法)

Cat #:GK3612-100T

### 一、试剂盒组成、规格、储存:

成分	100T	储存
Hoechst 33258 工作液	100ml	4℃避光保存
固定液	100ml	4℃保存
抗荧光淬灭封片剂	10ml	4℃避光保存
说明书	一份	

### 二、产品简介:

本试剂盒是利用荧光染料 (bisbenzimidazole, 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。

### 三、注意事项:

- 1、Hoechst 工作液对人体有害, 请注意防护。
- 2、固定液有刺激性气味, 建议在通风橱进行固定。
- 3、支原体检测时, 最好用不含抗生素的培养液培养 2~3 代, 比较容易避免假阴性结果。
- 4、本试剂盒用于 6 孔板检测时, 可以进行 50 次检测反应。
- 5、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, 即将被检测样品接种于 Vero 细胞进行检测。

### 四、使用方法 (仅供参考):

贴壁细胞:

- 1、被检细胞接种于无菌的 6 孔或 24 孔细胞培养板中, 接种密度为  $1-2 \times 10^4$ 。同时, 接种正常无支原体感染的同种细胞, 作为阴性对照。或者将正常生长细胞消化成单个细胞, 将细胞悬液接种 24 孔细胞爬片上。
- 2、培养 5 天后, 先吸去培养液, 再加入 1ml 的固定液, 静置 20min。
- 3、吸去固定液, 晾干。
- 4、于每孔中, 加入 1ml 的 Hoechst33258 工作液 (Hoechst 33258 工作液须覆盖全部被检细胞), 37℃避光放置 15-20min 或室温静置 20~30min。
- 5、吸去 Hoechst 33258 工作液, 加入 2ml 灭菌超纯水洗涤三次, 直接风干。风干后加入一滴封片液, 并以盖玻片覆盖或将爬片置于载玻片上。
- 6、荧光显微镜观察。用紫外激发光激发, 观察细胞周围是否有蓝色荧光小点或串珠状荧光小点。

悬浮细胞:

- 1、收集需检测的细胞, 1500rpm, 5min。
- 2、将收集的细胞涂片于载玻片上, 再加 1ml 的固定液, 静置 20min。
- 3、吸去固定液, 晾干。
- 4、于每孔中, 加入 1ml 的 Hoechst33258 工作液 (Hoechst 33258 工作液须覆盖全部被检细胞), 37℃避光放置 15~20min 或室温静置 20~30min。
- 5、吸去 Hoechst 33258 工作液, 用无菌水洗涤玻片 3 次, 直接风干。风干后加入一滴封片剂, 并以盖玻片覆盖。
- 6、荧光显微镜观察。用紫外激发光激发, 观察细胞周围是否有蓝色荧光小点或串珠状荧光小点。

### 结果判断 (参考):

阴性: 仅见细胞的细胞核呈现黄绿色荧光。

阳性: 除细胞外, 细胞周围可见大量的大小均一的荧光着色颗粒。