

## 细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI)

产品编号	产品名称	包装
C2030S	细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI)	200次
C2030M	细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI)	1000次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI), 即LIVE/DEAD Bacterial Staining Kit with DMAO & PI, 或LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit with DMAO and PI, 也称细菌活力检测试剂盒(Bacterial Viability Assay Kit)或细菌毒性检测试剂盒(Bacterial Cytotoxicity Assay Kit), 是一种高效、便捷、灵敏的基于DNA绿色荧光染料DMAO和红色荧光染料碘化丙啶(Propidium iodide, PI)的双荧光染色法检测细菌死活的试剂盒。本试剂盒检测时, 活细菌呈现绿色荧光, 死细菌呈现绿色和红色两种荧光。本试剂盒可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等荧光检测系统进行检测。
- DMAO, 即N, N-dimethylaniline N-oxide, 是一种核酸绿色荧光染料, 对于革兰氏阳性和阴性细菌均适用, 且既能染色活细菌, 也能染色死细菌。该染料具有膜通透性, 能透过细胞膜, 优先结合双链DNA。DMAO非常稳定, 在室温下进行常规操作和保存不易降解。PI是一种非渗透性荧光染料, 不能穿过具有生物活性的细胞质膜, 因此对于具有完整细胞膜的细菌不能染色。而对于坏死细菌, 其细胞膜的完整性丧失, PI可进入细胞核并与双链DNA结合, 并嵌入细菌的DNA双螺旋形成PI-DNA复合物从而产生红色荧光, 这种结合很少或几乎没有序列偏好, 每4-5个碱基对插入一分子PI染料[1,2]。将DMAO与PI联合使用检测细菌的死活, 具有完整细胞膜的活细菌呈现绿色荧光, 细胞膜受损的死细菌同时呈现绿色与红色荧光[3-6]。
- DMAO-DNA复合物的最大激发光波长为503nm, 最大发射光波长为530nm; PI-DNA复合物的最大激发光波长为535nm, 最大发射光波长为617nm。DMAO-DNA和PI-DNA的激发光谱和发射光谱参考图1, 可分别使用FITC和Cy3通道观察。

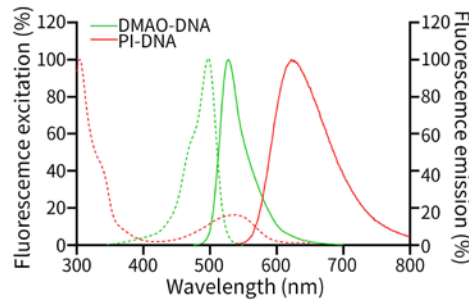


图1. DMAO-DNA和PI-DNA的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒提供的DMAO与PI均为1000X的储存液, 溶液经过优化, 对大多数细菌都适用, 但为了获得更满意的结果, 对于不同类型的细菌请自行进行一定的浓度摸索, DMAO和PI的使用终浓度一般为0.5-2X, 最优先的推荐终浓度为1X。同时, 本试剂盒提供检测缓冲液, 该缓冲液可用于细菌死活染色工作液的配制。使用本试剂盒检测细菌死活的效果参考图2。

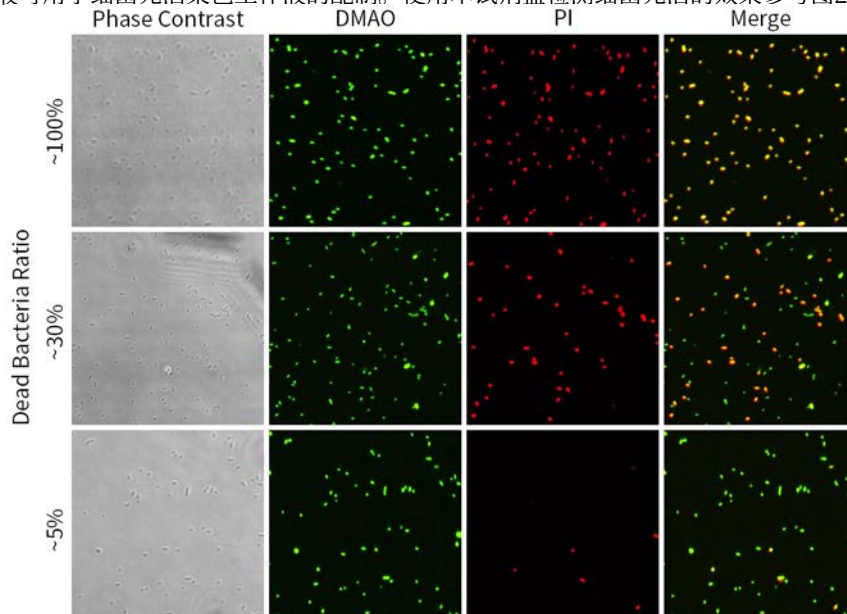


图2. 碧云天细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI) (C2030)对大肠杆菌DH5α菌株染色的效果图。DMAO和PI双染叠加(Merge)后可以非常清晰地观察到活细菌和死细菌的荧光染色差别。死细菌组(Dead Bacteria Group)即Dead Bacteria Ratio为~100%组, 红绿荧光染色数目基本一致, 两种荧光几乎完全重合, 叠加后呈黄色; 活细菌与死细菌混合组(Live/Dead Bacteria Group)即Dead Bacteria Ratio为~30%组, 两种荧光叠加后, 活细菌呈绿色, 死细菌呈黄色; 活细菌组(Live Bacteria Group)即Dead Bacteria Ratio为~5%组, 两种荧光叠加后, 可见基本为绿色荧光, 黄色荧光基本不见或仅个别可见。实际检测效果会因实验条件、染料浓度、细菌种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

➤ 本试剂盒使用荧光酶标仪检测细菌死活标准品的效果参考图3, 在0-100%的细菌存活率范围内有良好的线性关系。

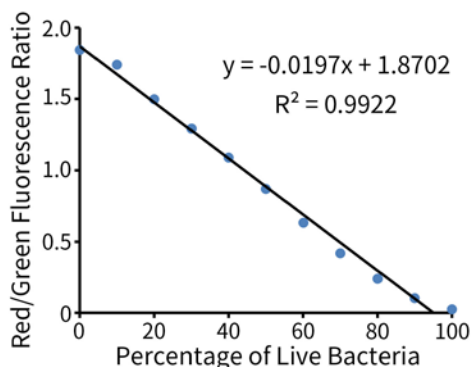


图3. 碧云天细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI) (C2030)对不同细菌死活比例DH5α菌株的检测效果。活细菌占比越高, 红色荧光越少, 红绿比值越低。实际检测数据会因实验条件、染料浓度、细菌种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

➤ 本试剂盒小包装和中包装用于荧光显微镜或荧光酶标仪检测时, 可以分别进行200次和1000次的检测。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C2030S-1	DMAO (1000X)	20μl
C2030S-2	PI (1000X)	20μl
C2030S-3	检测缓冲液	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2030M-1	DMAO (1000X)	100μl
C2030M-2	PI (1000X)	100μl
C2030M-3	检测缓冲液	5ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中DMAO (1000X)和PI (1000X)须避光保存。

#### 注意事项:

- 细菌染色前应去除培养基, 培养基内的组分会结合DMAO与PI染料, 使染色效率降低。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 初次使用时DMAO (1000X)和PI (1000X)可适当分装后-20°C保存, 以避免反复冻融。
- 检测缓冲液经过过滤除菌处理, 在使用时须注意避免微生物污染, 否则很可能严重影响染色效果。如果检测缓冲液发生浑浊等明显的微生物污染, 就不能继续使用。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. 细菌死活染色工作液(100X)的配制:

96孔板每孔所需细菌死活染色工作液(100X)的量为1μl, 其它培养器皿的细菌死活染色工作液的用量以此类推; 对于细菌悬液500-1000万细菌所需细菌死活染色工作液(100X)的量为1μl, 其它细菌数的细菌死活染色工作液(100X)的用量以此类推。取适量DMAO (1000X)和PI (1000X), 使用检测缓冲液将DMAO (1000X)和PI (1000X)稀释至100X, 例如取10μl DMAO (1000X)和10μl PI (1000X)加入80μl检测缓冲液中, 混匀后即为100μl细菌死活染色工作液(100X)。

注1: 配制细菌死活染色工作液(100X)时应注意避光, 且须现配现用, 不可长期保存。

注2: 细菌死活染色工作液中DMAO和PI的最终浓度需根据不同细菌菌株和实验体系通过预实验进行优化。

## 2. 荧光显微镜检测:

- 细菌培养。**在合适的液体培养基中培养细菌至对数生长期。
- 细菌准备。**取适量菌液, 10,000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用生理盐水(ST341)洗涤1次, 然后用生理盐水将菌液浓度调整至约 $10^8$ 个细菌/ml ( $OD_{670} \approx 0.3$ )。
- 染色。**按照每100 $\mu$ l菌液, 加1 $\mu$ l染色工作液(100X)的比例混匀。37°C避光孵育15分钟。不同的细菌菌种最佳孵育时间可能有所不同, 以15分钟作为初始孵育时间, 后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化, 以得到更加理想的染色效果。
- 检测。**孵育结束后, 取10 $\mu$ l的菌液滴加在载玻片(FSL051)上, 并盖上24mm方形盖玻片(FCGF24), 在荧光显微镜下观察染色效果。DMAO为绿色荧光, Ex/Em=503/530nm; PI为红色荧光, Ex/Em=535/617nm。本产品对于大肠杆菌DH5 $\alpha$ 菌株的荧光染色效果参考图2。

注: 由于细菌比较小, 观察会有一些的难度, 且荧光容易淬灭, 须进行预实验, 尽量调整好参数后再观察。

## 3. 流式细胞仪检测:

- 细菌培养。**在合适的液体培养基中培养细菌至对数生长期。  
注: 细菌培养基中含有的碎片可能会影响流式结果, 建议细菌培养基0.2 $\mu$ m过滤处理。
- 细菌准备。**取适量菌液, 10,000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用生理盐水洗涤1次, 然后用生理盐水将菌液浓度调整至约 $10^8$ 个细菌/ml ( $OD_{670} \approx 0.3$ )。再用生理盐水以1:100稀释, 使最终菌液浓度为 $10^6$ 个细菌/ml。
- 单染工作液(100X)的配制。**使用检测缓冲液将DMAO (1000X)和PI (1000X)分别稀释至100X, 例如取1 $\mu$ l DMAO (1000X)加入9 $\mu$ l检测缓冲液中, 混匀后即成为10 $\mu$ l DMAO单染工作液(100X); 取1 $\mu$ l PI (1000X)加入9 $\mu$ l检测缓冲液中, 混匀后即成为10 $\mu$ l PI单染工作液(100X)。
- 染色。**取1ml菌液, 加10 $\mu$ l的细菌死活染色工作液(100X)比例混匀。同时取1ml菌液, 加入10 $\mu$ l检测缓冲液, 用作流式细胞仪检测时的阴性对照。另外, 需要准备两管1ml细菌菌液, 分别加入10 $\mu$ l DMAO单染工作液(100X)或10 $\mu$ l PI单染工作液(100X), 用于流式单染的补偿调节。37°C避光孵育15分钟。不同的菌种最佳孵育时间可能有所不同, 以15分钟作为初始孵育时间, 后续可以根据实际检测效果对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- 检测。**孵育完成后, 可以直接进行流式细胞仪检测, 也可以10,000×g室温离心5分钟沉淀细菌, 吸净液体后每个样品加入0.5ml生理盐水重悬细胞后用流式细胞仪检测。DMAO为绿色荧光, Ex/Em = 503/530nm; PI为红色荧光, Ex/Em = 535/617nm。注意整个过程均需注意避光操作。染色后, 将样品置于冰上, 并尽量在1小时内进行流式细胞仪检测和分析。

注1: 使用仅含缓冲液、并且未经染色的细菌菌液用于流式细胞仪的阴性对照设置。

注2: 细菌圈门(Gate)时, 注意不要圈入细菌碎片, 并使用DMAO或PI单染的细菌进行调节补偿。双染细菌流式检测应获得两个相对独立的细菌群: 只有绿色荧光的活细菌群及绿色与红色荧光双染的死细菌群。

注3: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对DMAO或PI的稀释倍数进行适当调整。

注4: 由于细菌比较小, 建议使用专门的能检测细菌的流式细胞仪。

注5: 流式细胞仪参数的设置对于细菌的检测很关键。建议通过绿色荧光或者红色荧光对侧向散射结果图(SSC), 圈出细菌群, 然后通过绿色荧光对红色荧光流式结果图展示细菌群的分布。菌死活的浓度计算可以通过绿色或者红色荧光对侧向散射流式结果图、或者绿色荧光对红色荧光流式结果图, 根据实际情况选择活死菌分群最明显的结果图来进行计算。

注6: 死活菌群的分布位置可能会因细菌种类、仪器参数设置而存在一些差别, 某些点会分布于划定区域以外, 须进行适当的评估和参数的调整。

## 4. 荧光酶标仪检测细菌死活的变化:

- 细菌培养。**在合适的液体培养基中培养细菌至对数生长期。
- 细菌准备。**取适量菌液, 10,000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用生理盐水洗涤1次; 然后用生理盐水将菌液浓度调整至约 $10^8$ 个细菌/ml ( $OD_{670} \approx 0.3$ )。再用生理盐水以1:100稀释, 使最终菌液浓度为 $10^6$ 个细菌/ml。
- 染色。**按照100 $\mu$ l菌液/孔加入96孔板中, 每孔加1 $\mu$ l的细菌死活染色工作液(100X), 混匀。37°C避光孵育15分钟。不同的菌种最佳孵育时间可能有所不同。以15分钟作为初始孵育时间, 后续可以根据实际检测效果对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- 检测。**孵育结束后, 用荧光酶标仪检测RFU (Relative fluorescence values)。DMAO为绿色荧光, Ex/Em=503/530nm; PI为红色荧光, Ex/Em=535/617nm。

## 5. 荧光酶标仪检测细菌死活的比率: 本方法通过设置细菌死活标准曲线, 可计算出待测样品中活细菌与死细菌的比例。

- 细菌培养。**在合适的液体培养基中培养细菌至对数生长期。
- 细菌死活样品准备。**
  - 取等量菌液于2支1.5ml离心管中, 10,000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用生理盐水洗涤1次。
  - 1支菌液加入生理盐水, 为活细菌样品(Live Bacteria); 另1支菌液乙醇(或异丙醇)/生理盐水混合溶液(乙醇或异丙醇:生理盐水=7:3), 为死细菌样品(Dead Bacteria)。用各自溶液将2支菌液样品浓度调整至约 $10^8$ 个细菌/ml ( $OD_{670} \approx 0.3$ )。
  - 将2支样品在室温下孵育1小时, 每15分钟混匀1次。
  - 10,000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用生理盐水洗涤1次, 然后用相应体积的生理盐水重悬至约 $10^8$ 个细菌/ml。
  - 用生理盐水以1:100稀释, 使最终菌液浓度为 $10^6$ 个细菌/ml, 备用。
- 细菌死活标准品设置。**如下表所示, 按照对应的比率在96孔板相应孔中混合两种细菌悬液以获得所需的细菌死活标准品。

Well Number	Percentage of Live Bacteria (%)	Volume of Live Bacteria (μl)	Volume of Dead Bacteria (μl)
1	0	0	100
2	10	10	90
3	20	20	80
4	30	30	70
5	40	40	60
6	50	50	50
7	60	60	40
8	70	70	30
9	80	80	20
10	90	90	10

d. 染色和检测步骤同步步骤4c-4d。

e. 根据检测数据拟合细菌死活标准曲线。对于大肠杆菌DH5α菌株，本试剂盒检测细菌死活标准品效果参考图3。

#### 参考文献：

1. Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Methods Cell Biol. 1989. 30:417-48.
2. Waring MJ. J Mol Biol. 1965. 13(1):269-82.
3. Davey HM, Kell DB. Microbiol Rev. 1996. 60(4):641-696.
4. Lehtinen J, Nuutila J, Lilius EM. Cytometry A. 2004. 60(2):165-172.
5. Virta M, Lineri S, Kankaanpää P, Karp M, Peltonen K, et al. Appl Environ Microbiol. 1998. 64(2):515-519.
6. Banning N, Toze S, Mee BJ. J Appl Microbiol. 2002. 93(1):69-76.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0052S	BacTiter-Lumi™ 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	100次
C0052M	BacTiter-Lumi™ 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	500次
C0052L	BacTiter-Lumi™ 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	2500次
C0053S	BacTiter-Lumi™ Plus 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	100次
C0053M	BacTiter-Lumi™ Plus 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	500次
C0053L	BacTiter-Lumi™ Plus 发光法微生物细胞活力检测试剂盒	2500次
C2015S	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	100次
C2015M	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	500次
C2015L	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	2500次
C2030S	细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI)	200次
C2030M	细菌死活染色试剂盒(DMAO/PI)	1000次
RG039S	Bac-Lumi™ 细菌萤火虫荧光素酶检测试剂	100次
RG039M	Bac-Lumi™ 细菌萤火虫荧光素酶检测试剂	1000次
ST341-500ml	生理盐水(0.9% NaCl, 无菌)	500ml

Version 2024.04.19