

Live & Dead Bacterial Staining Kit 活细菌/死细菌染色试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Live & Dead Bacterial Staining Kit 活细菌/死细菌染色试剂盒	40274ES60	100 T

产品描述

试剂盒内含两种荧光染料 DMAO 和 EthD-III，可分别将活细菌和死细菌染上绿色和红色。其中 DMAO 是一种绿色核酸荧光染料，可染色活细菌和死细菌。EthD-III 是一种红色核酸荧光染料，仅染色细胞膜受损的死细菌。将 DMAO 和 EthD-III 混合使用染色时具有完整细胞膜的细菌呈现绿色，而具有受损细胞膜的细菌呈现绿色和红色。结果可以通过荧光显微镜或流式细胞仪来分析，适用于大多数细菌类型。

细菌活力的常见标准是细菌在合适的营养培养基中繁殖的能力，称为生长测定。该试剂盒通常与在液体或固体培养基中的生长测定结果有着很好的一致性。在某些条件下，膜损伤的细菌可能会在营养培养基中恢复并繁殖，而这种细菌在该测定中可能会被认为死亡。相反，一些具有完整膜的细菌可能无法在营养培养基中繁殖，但这些细菌在该测定中可能被认为是活的。因此，如果发现该检测和细菌生长测定之间有相当大的差异，应该考虑上述的可能性。

光谱特性 DMAO: Ex/Em=503/530nm (with DNA); EthD-III: Ex/Em=530/620nm (with DNA)

产品组分

编号	组分名称	产品编号/规格
		40274ES60 (100 T)
40274-A	DMAO	100 μ L
40274-B	EthD-III	200 μ L

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。储存于 4 $^{\circ}$ C，至少可以储存 6 个月。

注意事项

- 1) 操作时请采取防护措施，穿防护服、戴一次性手套等。
- 2) 本产品仅作科研用途！

使用方法

活、死细菌样品对照制备 (可选)

1. 在液体培养基中培养 4 mL 的细菌至晚期对数期。
2. 在 EP 管中准备两份 1 mL 的细菌液，并在 5,000 - 10,000 g 条件下离心 10-15 min。
3. 去除上清液，在其中一支 EP 管中加入 0.3 mL 的 0.85% NaCl 重悬细菌，在另一管中加入 1 mL 的 0.85% NaCl 重悬细菌。
4. 在含有 0.3 mL 的 0.85% NaCl 的管中加入 0.7 mL 异丙醇，充分混合 (最终浓度为 70% 的异丙醇) 用以制备死细菌样品。
5. 将两种样品在室温下孵育 1 h，每 15 min 混合一次。
6. 两种样品在 5,000-10,000 g 条件下离心 10-15 min。
7. 去除上清，在两种样品中加入 1 mL 的 0.85% NaCl 重悬细菌，并如步骤 6 再次离心。
8. 使用分光光度计测定两种菌悬液在 670 nm 处的吸光值 (OD_{670})。
9. 将两种菌悬液 (活的和死亡的) 密度调整到 10^8 个细菌/mL ($OD_{670} \approx 0.3$)，然后用 0.85% 的 NaCl 以 1: 100 稀释，使最终密度为 10^6 个细菌/mL。

10. 如下所示混合两种菌悬液以获得所需的活细胞：死细胞比率。

表 1. 活、死菌悬液按一定体积混合以达到所需的活细胞、死细胞比例

活细胞：死细胞	活菌悬液体积 (mL)	死菌悬液体积(mL)
0:100	0	1.0
10:90	0.1	0.9
20:80	0.2	0.8
30:70	0.3	0.7
40:60	0.4	0.6
50:50	0.5	0.5
60:40	0.6	0.4
70:30	0.7	0.3
80:20	0.8	0.2
90:10	0.9	0.1
100:0	1.0	0

荧光显微镜的染色方法

1. 将 1 体积的 DMAO 和 2 体积的 EthD-III 在微量离心管中混合，充分混合后加入 8 体积的 0.85% NaCl 溶液以得到 100×染料溶液。
2. 每 100 μ L 菌悬液，加 1 μ L 的 100×染料溶液。
3. 充分混合，室温下在黑暗中孵育 15 min。
4. 取 5 μ L 染色后的菌悬液滴在带有 18 mm 方形盖玻片的载玻片上。
5. 在荧光显微镜下观察。活细菌和死细菌的荧光可以在任何标准的 FITC 长效过滤器下同时观察到。或者，活的（绿色荧光）和死的（红色荧光）细菌可以分别用 FITC 和 Cy3（或 TexasRed）通道观察。

注意：1) 在对细菌染色之前，必须注意除去生长介质的残留。核酸和其他培养基组分可以以某种方式结合 DMAO 和 EthD-III 染料，导致不可接受的染色变化。简单的洗涤步骤通常足以从细菌悬浮液中除去干扰介质组分。不建议使用磷酸盐缓冲液，因为它们会降低染色效率。

2) 在开始正式实验前应调节染料浓度来使 DMAO 标记活细菌、使 EthD-III 标记死细菌进行区分。最佳浓度可能因细菌菌株的不同而异。一般最好使用能够提供充足信号的最低染料浓度。以下条件针对大肠杆菌活/死细胞染色进行了优化。

细胞流式的染色方法

实验开始前，请阅读荧光显微镜染色步骤下的注意事项。

1. 根据表 1，在 EP 管中加入 11 种不同比例的活细菌和死细菌。11 种样品中每种体积 1 mL。
2. 将 12 μ L 的 DMAO 储备溶液与 24 μ L 的 EthD-III 储备液在微量离心管中混合。11 个样品中的每个加入 3 μ L 的混合染料，通过上下吹打几次彻底混合。（注意：需要准备另外的对照细菌样品用于单独的 DMAO 和单独的 EthD-III 染色）
3. 室温下在黑暗中孵育 15 min。
4. 使用流式细胞仪分析每个样品，使用 DMAO 阳性细胞的 FITC 通道和 EthD-III 阳性细胞的 PI 或 PE 通道。