

## 活细菌/死细菌染色试剂盒

产品货号：BA1619

产品规格：100T

### 产品简介：

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（withNDA）；EthD-III：Ex/Em=530/620nm（withNDA）。

### 产品组成：

产品名称	规格	保存条件
活细菌/死细菌染色试剂盒	100T	2-8℃，避光

### 使用方法：

#### 活、死细菌样品对照制备

1. 在液体培养基中培养4mL的细菌至晚期对数期。
2. 在EP管中准备两份1mL的细菌液，并在5,000-10,000g条件下离心10-15min。
3. 去除上清液，在其中一支EP管中加入0.3mL的0.85% NaCl重悬细菌，在另一管中加入1mL的0.85% NaCl重悬细菌。
4. 在含有0.3mL的0.85% NaCl的管中加入0.7mL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1h，每15min混合一次。
6. 两种样品在5,000-10,000g条件下离心10-15min。
7. 去除上清，在两种样品中加入1mL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670nm处的吸光值（OD670）。
9. 将两种菌悬液（活的和死亡的）密度调整到 $10^8$ 个细菌/mL（OD670 $\approx$ 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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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100μL菌悬液，加1μL的100×染料溶液。
3. 充分混合，室温下在黑暗中孵育15min。
4. 取5μL染色后的菌悬液滴在带有18mm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种样品中每种的体积1mL。
2. 将12μL的DMAO储备溶液与24μL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3μL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。

#### 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。

**有效期：** 2-8℃，12个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com