天净沙系列

CAT#:240506

低温运输和保存

死细菌活细菌染色试剂盒（DMAO-PI 法）

DMAO-PI Live and Dead Bacteria Stain Kit

使用手册 V0.82

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是活细菌死细菌双染试剂盒（DMAO-PI 法），它具有下列特点:

1. 适用于各种细菌，包括枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌等等。
2. 本试剂盒在使用时活细菌呈现绿色荧光，死细菌呈现红色荧光。
3. 两种染料的最大激发和发射波长分别是 503/530 nm（DMAO）和 535/617 nm（PI），可分别使用 FITC 和 Cy3 通道观察。
4. 兼容于荧光显微镜，荧光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪或其它荧光检测仪器。
5. 本产品足够 40 次 1 mL 细菌的荧光显微镜检测和流式细胞仪检测，200 次 100 μL 菌液的荧光酶标仪检测。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
1000×DMAO 溶液	240506a	20 μL	0.5 mL 棕色管
1000×PI 溶液	240506b	20 μL	0.5 mL 棕色管
检测缓冲液	240506c	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	240506sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃避光保存，有效期一年。

自备试剂

0.85% NaCl 溶液，70%异丙醇

使用方法

一、 100×细菌死活染色工作液的配制，以 100 μL 为例（如需其他比例可自行换算）:

1. DMAO 和 PI 的使用终浓度一般为 0.5-2×，最优先的推荐终浓度为 1×，初次使用可做不同终浓度的梯度测试效果。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。
2. 将 10 μL 1000×DMAO 溶液和 10 μL 1000×PI 溶液与 80 μL 检测缓冲液混合，混匀后即为 100×细菌死活染色工作液。
3. 如，对 96 孔板，每孔 100 μL 待测菌液，则需 100×细菌死活染色工作液 1 μL（即终浓度 1×），故有 N 个孔的样本就需要 N μL。对于细菌悬液，每 500-1000 万细菌需要 100×细菌死活染色工作液 1 μL。每次需要配置多少 100×细菌死活染色工作液可以按上述比例增减。

注意：用本试剂盒进行细菌染色，务必要小心去除培养基残留，因为，核酸和其它培养基成分可能以不可预料的方式与 DMAO 和 PI 结合，导致染色结果发生不可接受的变动。简单的一次清洗步骤通常足以去除培养基内含的培养基成分干扰物残留。不建议使用磷酸盐清洗缓冲液，因此可能降低染色效率。

二、 细菌悬液制备

4. 细菌培养。在合适的液体培养基中培养细菌至对数生长期。
5. 细菌准备。取 25 mL 菌液，10，000×g 室温离心 10-15 分钟，弃上清，用 0.85% NaCl 溶液洗涤 1 次，再用 2 mL 0.85% NaCl 溶液将菌液重悬。
6. 取 1 mL 重悬菌液分别加入含 20 mL 0.85% NaCl 或适当缓冲液的 30-40 mL 离心管（设置为活细菌组），用含 20 mL 70%异丙醇（也可以用其他方法比如高热处理杀死细菌）的 30-40 mL 离心管（设置为死细菌组）。
7. 两管样品（分别为活细菌组和死细菌组）于室温孵育 1 h，每隔 15 min 颠倒混匀一次。
8. 两管样品（分别为活细菌组和死细菌组）于 10000×g 离心 10-15 min。
9. 用 20 mL 0.85% NaCl 或适当缓冲液重悬沉淀，并且按照步骤再离心一次。
10. 分别用 10 mL 0.85% NaCl 或适当缓冲液重悬两管样品。可将浓度调整至 1E6 个细菌/毫升。
11. 按检测需求（根据检测方式确定待测样品的量）取相应体积的菌液进行染色。DMAO 和 PI 的使用终浓度一般为 0.5-2×，最优先的推荐终浓度为 1×，初次使用可做不同终浓度的梯度测试效果。对于大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的建议染色浓度为 1×，染色时长为 15-25 min。不同种的细菌最佳孵育时间可能有所不同，用户可以根据实际染色效果对染色时间和染料浓度进行适当调整和优化。如果初次染色绿色荧光信号低可以将活菌组先只加 DMAO 染料进行孵育，镜检有绿色荧光后再进行 PI 染色。

三、 利用荧光显微镜检测死细菌活细菌的操作流程：

12. 活菌和死菌的荧光可能用标准的荧光素长通滤片设置来同时观察。替代方案的话，活菌（绿色荧光）和死菌（红色荧光）可分别用双通道：荧光素 FITC 和 Texas Red 带通滤光片设置。在荧光显微镜下观察染色效果。活菌呈绿色荧光，死菌呈红色荧光。DMAO 的 Ex/Em=503/530 nm，PI 的 Ex/Em=535/617 nm。

Omega 滤光片	Chroma 滤光片	注意事项
XF25，XF26，XF115	11001，41012，71010	可观察 DMAO 和 PI
XF22，XF23	31001，41001	可用于观察 DMAO
XF32，XF43，XF102，XF108	31002，31004，41002，4100	可用于观察 PI
油镜 100×计数＞5 个视野，计算存活率：存活率（%）=绿色荧光细胞数/（绿色+红色光细胞数）×100		

四、 利用流式细胞仪检测死细菌活细菌的操作流程：

13. FL1 通道：（530/30 nm）DMAO，FL3 通道：（＞670 nm）PI，阈值设定：排除粒径＜0.2 μm 碎片（避免假阳性）检测。

表型	DMAO 信号	PI 信号	生理状态判断
健康活菌	+++	-	膜完整

早期凋亡菌	++	+	膜轻微损伤
死菌	-	+++	膜裂解
VBNC（活不可培）	+	-	休眠，需结合 ATP 检测判断

14. 注意：由于流式检测比较灵敏，使用的荧光染料浓度可能要比荧光显微镜检测时所用的浓度要低，用户可以自行调节。建议使用能检测细菌的流式细胞仪。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在侧向散射结果图中圈出细菌群，再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。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，用户需进行适当优化。

五、 用荧光酶标仪检测死细菌活细菌：

15. 染色后，用荧光酶标仪检测 RFU（Relative Fluorescence Values）。DMAO 的 Ex/Em=503/530 nm，PI 的 Ex/Em=535/617 nm。

六、 注意事项：

16. 由于试剂盒内 DMAO 和 PI 的组分量少，室温回温充分融化后，务必低速离心沉至管底后再开盖。
17. 两款探针溶液本身就是溶于 DMSO 中，所以后续无需再单独添加，第一次使用可将 DMAO 和 PI 根据单次用量分装保存，密封后置于≤-20℃避光保存。
18. 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。
19. DMAO 和 PI 结合核酸，PI 是潜在的诱变剂，目前没有数据阐明 DMAO 的诱变性或毒性，两种试剂使用都需做恰当防护。
20. DMSO 能促进有机分子进入组织。强烈建议处理 DMSO 储存液时戴双层手套。
21. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

七、 常见问题及解决方案

问题	原因	解决方案
背景荧光高	染料残留或菌体自荧光	增加缓冲液洗涤次数（≥3 次），增加 0.1%BSA 阻断
革兰氏阳性菌染色弱	细胞壁阻挡 PI 渗透	预冷甲醇固定 5 min 或使用通透增强剂 0.1%TritonX-100
信号淬灭快	光照过度或氧化损伤	添加抗荧光淬灭剂
假阳性死菌	离心力导致机械损伤	离心力降至 5000×g 以下，改用滤膜浓缩法

关联产品 死细菌活细菌检测试剂盒（Syto 9-PI 法）