天净沙系列

CAT#:220950

低温运输和保存

死细菌活细菌染色试剂盒（SkyGreen 9-PI 法）

SkyGreen 9-PI Live & Dead Bacteria Staining Kit

使用手册 V0.81

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

活细菌死细菌双染试剂盒（SkyGreen 9/PI 法）是利用 SkyGreen 9 绿色核酸染料和碘化丙啶（PI）红色荧光核酸染料来进行细菌活力检测的试剂盒，其原理是 SkyGreen 9 能对所有待测细菌（活菌+死菌）进行标记，而 PI 只能渗透进入到细胞膜受损的死菌，故在活菌中只有 SkyGreen 9 染料，故呈绿色荧光，而在死菌中同时有 SkyGreen 9 和 PI 两种染料，故细菌呈红色荧光。在荧光显微镜下通过颜色即可分开两类细菌，通过检测两种荧光的比例可以反推出样本中活菌和死菌的比例。本方法原理示意图如下：

本产品基于上述原理开发，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. SkyGreen 9 和 PI 的最大激发和发射波长分别是 480/500 nm 和 490/635 nm。
3. 本试剂盒兼容于荧光显微镜，荧光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等。
4. 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。
5. 用于定量时需要自备制作标准曲线的细菌。
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
3.34 mM SkyGreen 9 溶液	220950a	60 μL	0.5 mL 棕色管
20 mM PI 溶液	220950b	60 μL	0.5 mL 棕色管
Mounting oil	220950c	2 mL	2.0 mL 本色管
使用手册	220950sc	1 份	1 份

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，细菌培养基（制作标准曲线用，培养基跟所测细菌种类相关）

使用方法

一、用前须知

1. 第一次使用可将 SkyGreen 9 和 PI 室温融化，低速短暂离心，然后根据单次用量分装成小份密封后置于≤-20℃避光保存。
2. 试剂 C（Mounting oil）用于将细菌固定在膜上，25℃的折射率是 1.517±0.003。不要误用作显微镜的浸油（Immersion oil）。
3. SkyGreen 9 和 PI 均能够跟核酸结合，PI 是已知的潜在诱变剂，目前没有数据表明 SkyGreen 9 的诱变性或毒性，两种试剂使用都需做恰当防护。含此类染料的试剂经活性炭吸附后再进行废液处理。活性炭之后经焚烧来破坏染料。

二、制备活菌和死菌悬液（制作标准曲线用或对照用）

4. 用 30 mL 营养肉汤培养大肠杆菌或其他细菌，使其生长至对数生长后期。

5. 于 10,000×g 离心 10 分钟，吸弃上清液。

6. 用 2 mL 自备的 0.85% NaCl 溶液重悬细菌沉淀。

7. 取 1 mL 重悬菌液加入到 20 mL 0.85% NaCl 溶液中（用作活细菌对照），另外 1 mL 加入到 20 mL 70% 异丙醇中（用作死细菌对照）。

8. 两管样品于室温孵育 1 小时，每隔 15 分钟颠倒混匀一次。

9. 两管样品于 10,000×g 离心 10 分钟。

10. 分别用 20 mL 0.85% NaCl 溶液重悬两管细菌沉淀。

11. 于 10,000×g 离心 10 分钟，吸弃上清液。

12. 分别用 10 mL 0.85% NaCl 溶液重悬两管样品得到活菌和死菌样品。

13. 分别取 3 mL 菌液测定 OD670 的值（可用玻璃或丙烯酸酯比色皿，1 cm 路径）。

14. 根据不同后续实验进行下面的操作。

三、荧光显微镜检测

15. 在离心管内将 SkyGreen 9 溶液和 PI 溶液按 1：1 的体积比混匀得到染料混合液。

16. 取 1 mL 活菌悬液和 1 mL 死菌悬液（来于第 13 步），各加入 3 μL 染料混合液混匀，此作为活菌和死菌对照。同时，用 0.85% NaCl 溶液将待测样品制备成 1 mL 悬液，也加入 3 μL 染料混合液混匀。室温避光孵育 15 分钟。

17. 各取 5 μL 染色的细菌悬液到载玻片上，并盖上 18 mm 方形盖玻片后在荧光素滤光片下观察活菌（绿色荧光）和 Texas Red 滤光片下观察死菌（红色荧光）。

四、荧光光度计检测（以大肠杆菌为例）

18. 调整大肠杆菌活/死菌悬液，使其密度均为 1E8 个细菌/mL（OD670=0.03）。

19. 按下表制备标准曲线样本:

样本号	加入活菌 mL	加入死菌 mL	活菌比
1	0	3	0%
2	0.75	2.25	25%
3	1.5	1.5	50%
4	2.25	0.75	75%
5	3	0	100%

20. 如果有 N 个待测样品，则准备（N+6）×9 μL 染料混合液 A。染料混合液 A 由 Sky Green 9 溶液和 PI 溶液 1：1 充分混匀而成。多准备的 5 个用于标准曲线样品，多 1 个的量为富余量。

21. 在 N 个样品管和 1-5 号标准曲线样品内各加入 9 μL 染料混合液 A，用枪上下吹打数次使其混匀。室温避光孵育 15 分钟。

22. 以 485 nm 为激发波长，530 nm 为发射波长（emission 1，绿色）来测定每个样品的绿色荧光，得到荧光值 G。

23. 以 485 nm 为激发波长，630 nm 为发射波长（emission 2，红色）来测定每个样

品的红色荧光，得到荧光值 R。

24. 计算每个样品的荧光比值 G/R。

25. 以 1-5 号样大肠杆菌活菌比为横坐标，以累积绿色荧光与红色荧光比（RatioG/R）为纵坐标，制作标准曲线，用待测样品 G/R 比值倒推出其活菌比。

五、荧光酶标仪检测（以大肠杆菌为例）

26. 调整大肠杆菌活/死菌悬液，使其密度均为 1E8 个细菌/mL（OD670=0.03）。

27. 按下表制备标准曲线样本:

样本号	加入活菌 mL	加入死菌 mL	活菌比
1	0	2	0%
2	0.5	1.5	25%
3	1.0	1.0	50%
4	1.5	0.5	75%
5	2	0	100%

28. 用 0.85% NaCl 溶液将测样品的细菌（死菌+活菌）浓度调到 1E8 个细菌/mL 待用。

29. 如果有 N 个待测样品，每个样品做三次重复，则需要准备 3×（N+6）×100 μL 染料混合液 B。多准备的 5 个用于标准曲线样品，1 个为富余量。

30. 染料混合液 B 配制（以 1mL 为例）：3 μL SkyGreen 9 溶液加 3 μL PI 溶液，再加入 2 mL 无菌水，充分混匀后即可。

31. 每个样品各取 100 μL 悬液到一个 96 孔板中，每个样品做三个平行样（每个样品用三个孔）。96 孔板的边缘孔空置以避免假读数。

32. 更换新的枪头，每孔加入 100 μL 染色混合液 B，上下吹打使充分混匀。

33. 室温避光孵育 15 min。

34. 以 485 nm 为激发波长，530 nm 为发射波长（emission 1，绿色）来测定每孔荧光，得到荧光值 G。

35. 以 485 nm 为激发波长，630 nm 为发射波长（emission 2，红色）来测定每孔荧光，得到荧光值 R。

36. 计算荧光比值 G/R。

37. 以 1-5 号样大肠杆菌活菌比为横坐标，以累积绿色荧光与红色荧光比（G/R）为纵坐标，制作标准曲线，用待测样品 G/R 比值从标准曲线上倒推出其活菌比。

六、流式细胞仪检测（以大肠杆菌为例）

38. 调整大肠杆菌活菌和死菌悬液，使其密度均为 1E8 个细菌/mL（OD_{670}=0.03）。之后用无菌去离子水稀释 100 倍使其最终密度为 1E6 个细菌/mL。

39. 按下表制备标准曲线样本:

样本号	加入活菌 mL	加入死菌 mL	活菌比
1	0	2	0%
2	0.5	1.5	25%

3	1.0	1.0	50%
4	1.5	0.5	75%
5	2	0	100%

40. 如果有 N 个待测样品，则准备（N+6）×6 μL 染料混合液 C。染料混合液 C 由 Sky Green 9 溶液和 PI 溶液 1：1 充分混匀而成。多准备的 5 个用于标准曲线样品，1 个的量为富余量。另外，还需各准备一支仅 SkyGreen 9 溶液和 PI 溶液单独染色的样本。
41. 在 N 个样品管和 1-5 号标准曲线样品内各加入 6 μL 染料混合液 C，用枪上下吹打数次使其混匀。室温避光孵育 15 分钟。
42. 以 Coulter EPICS V™ 流式细胞仪为例，使用 Cytomation CICERO 数据收集及分析。红色光电倍增管前含 610 nm 的吸收滤片；绿色光电倍增管前含有 515 nm 的阻断滤片和 590 nm 的二向色性滤片。鞘液为去离子水，大肠杆菌悬液的密度为 1 E6 个细菌/mL，样品的速率约为 300 粒子/秒。
43. 活菌和死菌都呈绿色荧光，故对数-累积绿色荧光 (LIGFL) 的信号值需设定为 15%，用以去除干扰。细菌群以横坐标为对数-累积红色荧光（LIRFL），横坐标为对数-累积绿色荧光（LIRFL）区分为三个区域，区域内发现的细菌数用于评估菌群中活菌所占比例。

关联产品	SkyGreen 9 染料