天净沙系列

CAT#:220950-6

低温运输，2-8℃保存

天净沙

# 总细菌（活细菌和死细菌）计数试剂盒（SkyGreen 9 法）

Total Bacterial Count Kit (Live & Dead Bacteria, SkyGreen 9 Method)

## 使用手册 V0.5

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

本产品是总细菌（活细菌和死细菌）计数试剂盒（SkyGreen 9 法），采用高亲和力的荧光核酸染料 SkyGreen 9。该染料能够穿透大多数细菌的细胞膜，与 DNA 结合后发出绿色荧光。本试剂盒可实现水生系统（海水、淡水）、饮用水、工业水处理及食品环境样本中总细菌（包括活细菌和死细菌）的快速、精准定量计数。它具有下列特点：

1. 一站式，即开即用，用户不需要优化条件。
2. 能够同时检测样本中的活菌和死菌。
3. 染色时间短，实验简便。
4. 对海水和淡水样本均适用，抗环境背景干扰能力强。
5. 相比部分传统染料，SkyGreen 9 在流式检测中具有较低的背景噪声。
6. 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。
7. 本产品仅适用于科研。

## 规格及成分

本产品用小扁盒包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| SkyGreen 9 核酸染料 | 220950-6a | 10 μL | 1.0 mL 棕色管 |
| 10×染色缓冲液 | 220950-6b | 4 mL | 5.0 mL 本色瓶 |
| 标准计数微球 (1E6 beads/mL) | 220950-6c | 4 mL | 5.0 mL 本色瓶 |
| 使用手册 | 220950-6sc | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输，2-8℃保存，SkyGreen 9 核酸染料需-20℃避光保存；有效期一年。

## 自备物品

无菌稀释液、无菌过滤水。

## 使用流程

**以下操作过程需尽量避光，并使用无菌耗材**

**一、样本处理**

1. 采集水样，若含有大颗粒杂质，可通过 5 μm 孔径的滤膜进行预过滤，去除杂质干扰。
2. 若样本菌浓度过高，需使用无菌稀释液进行梯度稀释，确保流式细胞仪的进样浓度在 1E5~1E7 cells/mL 的最佳检测范围内。
3. 注：如果是海水样本，用 0.22 μm 滤膜过滤后的无菌原水（样本水）或人工海水稀释，不要用普通纯水或 PBS 稀释，否则海水细菌会因为渗透压骤降而破裂，导致计数偏低。如果是淡水，用无菌 PBS 或 0.22 μm 过滤的无菌纯水即可。

**二、染色**

4. 稀释染料：取 SkyGreen 9 核酸染料 10 μL，使用无水 DMSO 进行 100 倍稀释，配

制成 1 mL 的染料中间液（例如：取 10 μL 原液 + 990 μL 无水 DMSO，充分混匀）。该中间液建议分装后于-20℃避光保存，避免反复冻融。

5. 取 1 mL 处理好的水样至流式管中（上机前请务必确保进样针能够吸到液体）。如果您的流式仪进样针较短，可以适当减少样本体积（如 500 μL），同时按比例减少染料和微球的加入量，或者使用 1.5 mL 微量离心管上机（如仪器支持）。
6. 加入 20 μL 的染料中间液（通常工作浓度建议为 1-5 μM，需根据具体试剂浓度调整）。
7. 涡旋混匀，在室温（或 37℃）下避光孵育 10-15 分钟。

**三、绝对计数（加入内标）**

8. 标准计数微球使用前充分混匀；在染色孵育结束前，向样本中加入已知浓度的标准计数微球 100 μL（例如每管加入 1E5 个微球），充分混匀。

**四、流式细胞仪检测**

9. 开机与设置：开启流式细胞仪，使用 488 nm 激光器。设置前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC) 以及荧光通道 FL1 (530/30 nm)。
10. 阈值设定：利用无菌过滤水作为空白对照，设置合适的 FSC/SSC 阈值，排除背景噪音，并准备一管不加染料和微球的样本作为阴性对照。
11. 上机检测：将染色后的样本上机检测。在 FSC vs SSC 散点图中圈定细菌群体（通常与微球群体区分开）；在 FL1 直方图或散点图中，圈定 SkyGreen 9 阳性（发出绿色荧光）的群体。
12. 数据获取：每个样本采集约 10,000 个事件或固定体积。

**五、结果计算**

13. 利用流式细胞仪软件，通过加入的内标微球进行绝对计数计算：

    细菌浓度 (cells/mL) = (细菌事件数 / 微球事件数) × (微球加入总量 / 样本体积)

    （注：具体计算方式可参照您所使用的流式细胞仪软件内置的绝对计数模块）

**六、注意事项**

14. 避光操作：SkyGreen 9 染料对光敏感，配制和孵育过程务必避光（可使用铝箔纸包裹流式管）。
15. 温度控制：孵育温度需保持一致，温度波动可能影响染料结合效率。
16. 背景干扰：若样本（如某些海水样本）具有较高的自发荧光，建议设置未染色的空白对照以调节荧光补偿。
17. 储存条件：SkyGreen 9 原液通常需在-20℃避光保存，避免反复冻融。

| | |
|---|---|
| **关联产品** | 死细菌活细菌染色试剂盒（SkyGreen 9-PI 法） |

20261023sxl-wjw