

天
净
沙
系
列

CAT#:11-MK220950
常温运输和保存

BINGENE

死细菌活细菌染色试剂盒(SYTO9-PI 法)

SYTO9-PI Live and Dead Bacteria Stain Kit

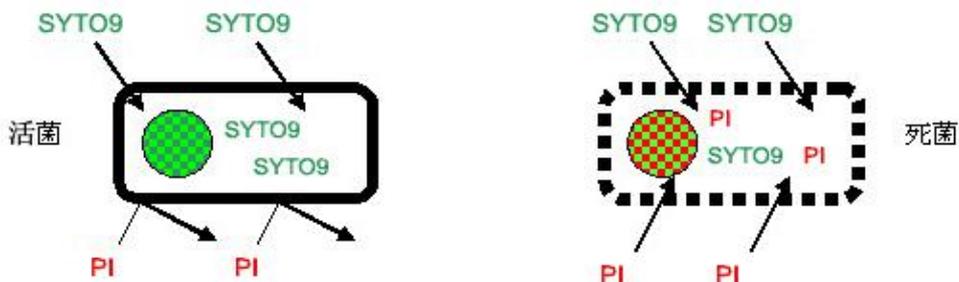
使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点

活细菌死细菌双染试剂盒（SYTO9/PI 法）是利用 SYTO9 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 SYTO9 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 SYTO 染料，故呈绿色荧光，而在死菌中同时有 SYTO9 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. 两种染料的最大激发和发射波长分别是 480/500nm (SYTO9) 和 490/635nm (PI)。
3. 本试剂盒兼容于荧光显微镜，荧光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪或其它荧光检测仪器。
4. 本产品足够 40 次 1mL 细菌的荧光显微镜检测和流式细胞仪检测，200 次 100 uL 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 5 孔盒包装

成份	编号	规格	包装材料
SYTO9 溶液, 3.34mM	11-MK220950a	60 μ L	0.5mL 棕色管
PI 溶液, 20mM	11-MK220950b	60 μ L	0.5mL 棕色管
Mounting oil	11-MK220950c	2 mL	2.0mL 本色盖
使用手册	11-MK220950sc	1 份	无

运输及保存

冰袋运输，-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 SYTO9 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 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

2. 组分 C (Mounting oil) 用于将细菌固定在膜上, 25°C 的折射率是 1.517 ± 0.003 。不要误用作显微镜的浸油 (Immersion oil)。
3. SYTO9 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 SYTO9 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 30mL 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 $10000 \times g$ 离心 10 分钟, 吸弃上清液。
6. 用 2mL 自备的 0.85% NaCl 溶液重悬细菌沉淀。
7. 取 1mL 重悬菌液加入到 20mL 0.85% NaCl 溶液中 (用作活细菌对照), 另外 1mL 加入到 20mL 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 $10000 \times g$ 离心 10 分钟。
10. 分别用 20mL 0.85% NaCl 溶液重悬两管细菌沉淀。
11. 于 $10000 \times g$ 离心 10 分钟, 吸弃上清液。
12. 分别用 10mL 0.85% NaCl 溶液重悬两管样品得到活菌和死菌样品。
13. 分别取 3mL 菌液测定 OD₆₇₀ 的值 (可用玻璃或丙烯酸酯比色皿, 1cm 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 SYTO9 溶液和 PI 溶液按 1: 1 的体积比混匀得到染料混合液。
16. 取 1mL 活菌悬液和 1mL 死菌悬液 (来于第 13 步), 各加入 3 μ l 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 1mL 悬液, 也加入 3 μ l 染料混合液混匀。
17. 室温避光孵育 15 分钟。
18. 各取 5 μ L 染色的细菌悬液到载玻片上, 并盖上 18mm 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)

19. 调整大肠杆菌活菌悬液和死菌悬液, 使其密度均为 1×10^8 个细菌/mL (OD₆₇₀=0.03)。
20. 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%

21. 如果有 N 个待测样品，则准备 $(N+6) \times 9\mu\text{L}$ 染料混合液 A。染料混合液 A 由 SYTO9 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。
22. 在 N 个样品管和 1-5 号标准曲线样品内各加入 $9\mu\text{L}$ 染料混合液 A，用枪上下吹打数次使其混匀。
23. 室温避光孵育 15 分钟。
24. 以 485nm 为激发波长，530nm 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。
25. 以 485nm 为激发波长，630nm 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。
26. 计算每个样品的荧光比值 G/R。
27. 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)

28. 调整大肠杆菌活菌悬液和死菌悬液，使其密度均为 1×10^8 个细菌/mL ($\text{OD}_{670}=0.03$)。
29. 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%

30. 用 0.85%NaCl 溶液将测样品的细菌 (死菌+活菌) 浓度调到 1×10^8 个细菌/mL 待用。
31. 如果有 N 个待测样品，每个样品做三次重复，则需要准备 $3 \times (N+6) \times 100\mu\text{L}$ 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。
32. 染料混合液 B 配制 (以 1mL 为例) : $3\mu\text{L}$ SYTO9 溶液加 $3\mu\text{L}$ PI 溶液，再加入 2 mL 无菌水，充分混匀后即可。
33. 每个样品各取 $100\mu\text{L}$ 悬液到一个 96 孔板中，每个样品做三个平行样 (每个样品

	<p>用三个孔)。96 孔板的边缘孔空置以避免假读数。</p> <p>34. 更换新的枪头，每孔加入 100μl 染色混合液 B，上下吹打使充分混匀。</p> <p>35. 室温避光孵育 15min。</p> <p>36. 以 485nm 为激发波长，530nm 为发射波长 (emission 1, 绿色) 来测定每孔荧光，得到荧光值 G。</p> <p>37. 以 485nm 为激发波长，630nm 为发射波长 (emission 2, 红色) 来测定每孔荧光，得到荧光值 R。</p> <p>38. 计算荧光比值 G/R。</p> <p>39. 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。</p>
<p>关联产品</p>	<p>SYTO9 染料</p>