

SYTO 9/PI Live/Dead Bacterial Double Stain Kit

活细菌/死细菌双染试剂盒

1. 产品简介:

活细菌/死细菌双染试剂盒 (SYTO 9/PI Live/Dead Bacterial Double Stain Kit) 是一款方便且操作简单的试剂盒, 利用SYTO 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的检测, 适用于大量的细菌种属, 包括蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、草分枝杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、奥拉尼堡沙门氏菌、宋内志贺氏菌和化脓性链球菌。

本试剂盒的工作原理在于: SYTO 9和PI的光谱特征以及穿透健康细菌细胞的能力不同。单独使用时, SYTO 9能对群体内的所有细菌进行标记—具有完整膜和受损膜的细菌; 相反, PI只能渗透进入受损的膜, PI的插入会引起SYTO 9染色荧光的降低, 当体系内加入两种染料时。因此, 通过适量比例的SYTO 9和PI的混合染色, 具有完整膜结构的细菌呈绿色荧光, 而具受损膜结构的细菌呈红色荧光。两者染料的最大激发和发射波长分别是480/500nm (SYTO 9) 和490/635nm (PI)。背景基本无荧光。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。

试剂盒组份:

组分	名称	包装	Storage
试剂A	SYTO 9 Solution (3.34mM)	150 μ l	-20° C avoid light 1year
试剂B	PI Solution (20mM)	150 μ l	
	Mounting oil, for bacteria immobilized on membranes	客户自备	

2. 注意事项:

- 1) 由于试剂盒内SYTO 9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。
- 2) 第一次使用可将SYTO 9和PI根据单次用量分装保存, 密封后置于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 3) Mounting oil, for bacteria immobilized on membranes用于将细菌固定在膜上, 25°C 的折射率是 1.517 ± 0.003 。不要用作浸油 (Immersion oil)。
- 4) SYTO 9和PI结合核酸, PI是潜在的诱变剂, 目前没有数据阐明SYTO 9的诱变性或毒性, 两种试剂使用都需做恰当防护。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。对于核酸染料, 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。
- 5) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

3. 操作步骤:

以下步骤仅用作示例以指导科研人员开展自身细菌样本的染色。

一、培养条件和细菌悬液的制备

【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SYTO9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。

- 1.1 用营养肉汤培养大肠杆菌或金黄色葡萄球菌（30ml）使其生长至对数生长后期。
- 1.2 于10000×g离心10-15min，浓缩25ml细菌培养物。
- 1.3 吸走上清液，用2ml 0.85% NaCl或适当缓冲液来重悬沉淀。
- 1.4 取1ml重悬菌液分别加入含20ml 0.85% NaCl或适当缓冲液的30-40ml离心管（用作活细菌），或含20ml 70% 异丙醇的 30-40ml离心管（用作杀死细菌）。
- 1.5 两管样品于室温孵育1h，每隔15min颠倒混匀一次。
- 1.6 两管样品于10000×g离心10-15min。
- 1.7 用20ml 0.85% NaCl或适当缓冲液重悬沉淀，并且按照步骤1.6再离心一次。
- 1.8 分别用10ml 0.85% NaCl或适当缓冲液重悬两管样品。
- 1.9 分别取3ml菌液测定670nm的光密度（OD₆₇₀），用玻璃或丙烯酸酯比色皿（1cm路径）。
- 1.10 对于大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的建议染色浓度，根据你的仪器类型（荧光显微镜、荧光光度计、荧光酶标仪）或流式细胞仪来参考相应部分的染色条件。

二、染色条件的优化

试剂盒内的两种染料都经过平衡优化，按照1: 1的比例进行混合用于绝大多数的样本都能得到良好的区分活/死细菌。偶然情况下，两种染料的混合比例需根据实际需求进行优化调整。比如：在待检样本中，绿色荧光太突出，建议要么降低SYTO 9浓度，要么提高PI浓度。

为了全面优化染色条件，建议测试梯度浓度的SYTO 9，每一种浓度与梯度浓度的PI进行组合染色。建议按照1ml细菌悬液加入3μl不同混合比率的染料预混液。

三、荧光显微镜操作步骤

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）可分别用荧光素和Texas Red带通滤光片设置。用于本试剂盒检测的建议荧光显微镜滤片设置见表1。

表1适用于本试剂盒检测用的常见滤光片特征

Omega滤光片*	Chroma滤光片*	注意事项
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	用于同时观察SYTO 9和PI染色的长通和双发射滤光片
XF22, XF23	31001, 41001	仅用于观察SYTO 9的带通滤光片
XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 4100	仅用于观察PI的带通滤光片
*: 用于荧光显微镜观察的推荐带通滤光片。Omega滤光片由Omega Optical提供，Chroma滤光片由Chroma Technology公司提供。		

- 3.1 在微量离心管内组合等量的组分A（SYTO 9）和组分B（PI），混匀。
- 3.2 每1ml细菌悬液内加入3 μl染料预混液。按照建议的稀释倍数，最终得到的染色工作液内含0.3% DMSO。更高浓度的DMSO可能对染色产生副效果。
- 3.3 混匀后室温避光孵育15min。
- 3.4 吸5 μl染色的细菌悬液到载玻片上，并盖上18mm方形盖玻片。
- 3.5 根据表1选择荧光显微镜上合适的滤片来观察。

四、荧光光度计操作步骤:

- 4.1 调整大肠杆菌悬液（活和杀死）使其密度为 1×10^8 个细菌/ml（~0.03 OD670）或金黄色葡萄球菌悬液（活和杀死）使其密度为 1×10^7 个细菌/ml（~0.15 OD670）。用于荧光光度计检测，金黄色葡萄球菌悬液的浓度通常比大肠杆菌少10倍。

- 4.2 参考表2在1cm 玻璃、丙烯酸酯或石英荧光比色皿混匀五种不同比例的细菌悬液。每个样本的总体积为3ml。

表2. 荧光光度计法检测活/死细菌所需不同比例活细菌和死细菌悬液的加量体积

活：死 细菌比例	m1活细菌悬液	m1死细菌悬液
0:100	0	3.0
10:90	0.3	2.7

50:50	1.5	1.5
90:10	2.7	0.3
100:0	3.0	0

4.3 在微量离心管内分别加30 μl组分A (SYTO 9) 和30 μl组分B (PI), 混匀。

4.4 每组不同比例的细菌悬液内加入9 μl染料预混液 (5个样本×9 μl =45 μl总量), 用枪上下吹打数次使其混匀。

4.5 室温避光孵育15min。

4.6 荧光测定和数据分析

①用荧光光度计测定每组细菌悬液 (Fcell) 的荧光发射光谱 (激发: 470nm, 发射: 490-700nm);

②分别测定发射光谱在510-540nm (em1, 绿色) 和620-650nm (em2, 红色) 的累积荧光, 并计算累积荧光比值:

$$\text{RatioG/R} = \text{Fcell, em1} / \text{Fcell, em2}$$

③以大肠杆菌悬液内活细胞的占比为横坐标, 以累积绿色荧光与红色荧光比 (RatioG/R) 为纵坐标, 制图。

五、荧光酶标仪操作步骤:

针对细菌悬液, 用荧光酶标仪的测定条件与荧光光度计的基本类似。如同荧光光度计的检测步骤, 染料浓度相同于荧光显微镜的建议浓度, 绿/红荧光比与活细菌相对数量呈正比。

5.1 调整大肠杆菌悬液 (活和杀死) 使其密度为 2×10^8 个细菌/ml (~ 0.06 OD670) 或金黄色葡萄球菌悬液 (活和杀死) 使其密度为 2×10^7 个细菌/ml (~ 0.3 OD670) 。用于荧光酶标仪检测, 金黄色葡萄球菌悬液的浓度通常比大肠杆菌少10倍。

5.2 参考表3在16×125mm高硼硅玻璃培养管内混匀五种不同比例的细菌悬液 (大肠杆菌或金黄色葡萄球菌) 。每个样本的总体积为2ml。

表3. 荧光酶标仪法检测活/死细菌所需不同比例活细菌和死细菌悬液的加量体积

活: 死 细菌比例	m1活细菌悬液	m1死细菌悬液
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
50:50	1.0	1.0
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

- 5.3 在微量离心管内分别加6 μ l组分A (SYTO 9) 和6 μ l组分B (PI), 混匀。
- 5.4 通过将所有的12 μ l上述预混液加入2ml无菌的dH₂O, 混匀后制备2 \times 染色混合液。
- 5.5 吸100 μ l细菌悬液混合物到平底96孔板的各孔内, 建议每个制备物做三个平行。96孔板的边缘孔通常空置以避免假读数。
- 5.6 更换新的枪头, 每孔加入100 μ l 2 \times 染色混合液, 上下吹打使充分混匀。
- 5.7 室温避光孵育15min。

5.8 荧光测定和数据分析

- ①以 \sim 485nm为激发波长, \sim 530nm为发射波长 (emission 1, 绿色) 来测定每孔荧光;
- ②以 \sim 485nm为激发波长, \sim 630nm为发射波长 (emission 2, 红色) 来测定每孔荧光;
- ③通过测定两种发射波长下的荧光强度, 并计算荧光比值: $\text{RatioG/R} = F_{\text{cell, em1}} / F_{\text{cell, em2}}$
- ④以大肠杆菌悬液内活细胞的占比为横坐标, 以RatioG/R为纵坐标, 制图。