LIVE/DEAD Bacterial Viability and Counting Kit, for flow cytometry

活死细菌染色试剂盒(可应用流式分析)

产品编号：MA0390　规格：　100T

产品内容：

产品组成	100T
meilungreen 核酸染料（3.34mM）	200ul
PI(碘化丙啶)（20mM）	200ul
标准微球	2ml
说明书	1 份

产品简介：

美仑活死细菌染色试剂盒（LIVE/DEAD Bacterial Viability and Counting Kit, for flow cytometry）可以通过流式细胞仪有效的区分活、死细菌并实现定量检测；而且对各类细菌的混合物也可以实现定量分析检测。该试剂盒采用两种核酸染料来进行细菌活力测定：绿色荧光染料meilungreen（美仑自主研发，功能等同于SYTO 9）以及红色荧光染料PI（碘化丙啶），并通过标准微球精准测量样品体积。用适当比例的meilungreen与PI混合物染色时，细胞膜完好的细菌发出明亮的绿色荧光，而细胞膜受损的细菌则表现出绿色荧光明显减弱，同时发出较强的红色荧光。细胞类型和革兰氏特征会影响死细菌产生红色荧光的强度。meilungreen与PI染料在大部分流式细胞仪中都是由488nm激光器实现有效激发的，各自的核酸复合物荧光信号可分别在绿色通道和红色通道中检测到，并且几乎没有背景荧光 。

标准微球悬浮液作为样品体积的参考标准，尺寸和荧光经过仔细筛选，以确保微球在流式细胞检测中荧光--侧向散射图中可以明显的区别于被染色的细菌。用meilungreen和PI对细菌培养液进行简单染色，在流式细胞仪上分析样本前加入固定数量的微球。活菌和死菌以及微球在荧光--侧向散射图中很容易区分，然后通过细胞图中细菌事件数与微球事件数的比值来计算死菌和活菌的浓度（图1）。

适用菌种范围：

本试剂盒适用菌种广泛，主要包括：蜡样芽胞杆菌、枯草杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、黄体微球菌、草分枝杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌、沙雷菌、宋内志贺菌、金黄色葡萄球菌和酿脓链球菌等。

细菌活力标准：

细菌的生存能力不能用简单的生理或者形态参数来定义，因此单一的生存能力测定可能会在实验中引入一定的偏差。某些条件下，细菌受损的细胞膜可能会修复，即使是这种细菌在实验中也可能被标记为“死”细菌。相反，一些细胞膜完整的细菌可能无法在营养培养基中繁殖，但却被认定为“活”细菌。结合几种不同的生存能力测定方法，如膜渗透性、酶活性和氧化还原电位，可以更全面地评估细菌的生存能力，并消除任何单一生存能力测定方法的固有限制。

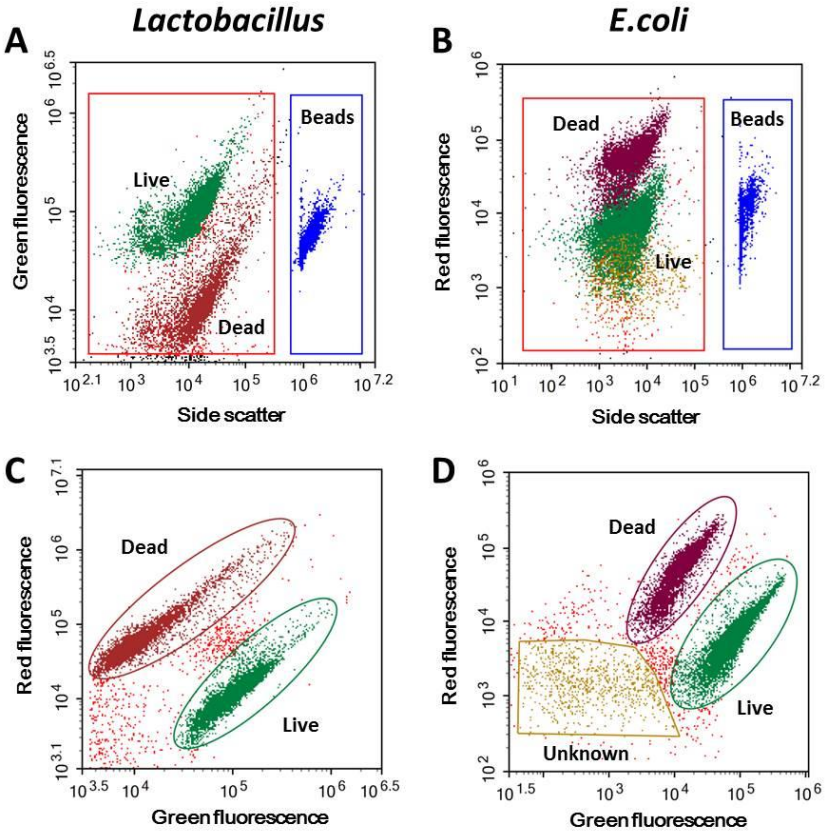

图1：活死细菌染色试剂盒流式检测结果。乳酸杆菌的活菌（未处理）、死菌（电穿孔处理）悬液按照一定比例混合后，采用本试剂盒的流式检测结果（图A、图C）；大肠杆菌的活菌（未处理）、死菌（70%乙醇处理）悬液按照一定比例混合后，采用本试剂盒的流式检测结果（图B、图D）。通过绿色荧光或者红色荧光对侧向散射结果图（图A、图B），分别圈出细菌群与标准微球群（分别为左侧和右侧的方形门）。通过绿色荧光对红色荧光流式结果图展示细菌群的分布。活、死菌的浓度计算可以通过绿色或者红色荧光对侧向散射流式结果图、或者绿色荧光对红色荧光流式结果图，根据实际情况选择活死菌分群最明显的结果图来进行计算。活、死菌群的分布位置会因细菌种类和参数设置而存在差别，一些点会分布于划定区域以外，也应进行适当的评估（如图D）。

优化染色：

本试剂盒提供的两种染料组分经过大量实验摸索，发现按照1:1比例的混合物工作液可以很好地分析大多数细菌。然而，有时还需调整两种染料的比例，以便更好地鉴别活菌和死菌。该试剂盒提供了独立包装的meilungreen和PI染料，实验人员能够根据情况对染料混合物进行微调，使其在各种条件下都能达到最佳染色效果。

使用说明：

以下实验方案以大肠杆菌检测为例，仅作为指导实验人员设计自己的细菌染色过程的参考。研究人员应用以下染色步骤对革兰氏阳性、阴性菌都是有效的。

1.准备菌悬液

以下步骤描述了制备活细菌（未处理）和死细菌（乙醇处理）菌悬液的步骤，也可以用来设定流式细胞仪参数，如有必要，还可对染料配比进行优化。因为流式细胞仪是用来检测染色细胞的荧光信号，因此该计数方法可用于多种细菌密度的测定。

培养细菌应使用低磷酸盐生长培养基，meilungreen 与 PI 可能会结合培养介质中的核酸和其他成分，从而产生一些无关的染色变化。步骤 1.5 的清洗步骤通常可以有效的去除菌悬液中干扰染色的成分，在清洗步骤中不推荐使用磷酸盐，因其可能会降低染色效率。

1.1 取 2 份 1ml 细菌悬液于微量离心管中，以 10000xg 离心 1-3 分钟。

1.2 弃上清，一份菌沉淀用 1ml 0.85% NaCl 溶液或其他适当的缓冲溶液（活菌），另一份菌沉淀用 1ml 70%乙醇重悬（死菌）。

1.3 室温下处理 30-60min，每隔 15 分钟混匀一次。

1.4 两种菌悬液均以 10000xg 离心 1-3 分钟，收集菌沉淀。

1.5 用 1ml 0.85% NaCl 或其他合适的缓冲溶液清洗，并再次 10000xg 离心 1-3 分钟，收集菌沉淀。

1.6 用 1ml 0.85% NaCl 或其他合适的缓冲溶液重悬样品。

1.7 选择步骤，如果未经处理的细菌需要保持最佳生长条件，只需要按照步骤 1.2 准备死菌。对于活菌，可以在使用前直接从液体培养基中分出经过 1 次清洗步骤即可。

2.细菌染色

以下步骤描述了按照步骤 1.1-1.6 制备细菌样品后的染色方法，样品数量增加时，染色步骤需要相应按比例增加。

2.1 取 967ul 0.85%NaCl 或其他合适的缓冲溶液到流式细胞分析检测管。

注：如果不加微球，等分体积为 987ul 每份。

2.2 向步骤 2.1 中的流式细胞检测管中加入 1.5ul meilungreen (3.34mM)核酸染料，1.5ul PI (20mM)。

2.3 向染料溶液中加入步骤 1.6 中的 10ul 菌悬液（OD=1.0，已稀释 10 倍处理）。如果菌悬液非常浑浊或 OD600 检测值大于 1，可以对其进行稀释后再加样，以便得到更准确的检测结果。

2.4 室温下避光孵育 15min。

2.5 充分涡旋标准微球悬液，通过水浴超声 5-10min。染色后的样品中加入 20ul 微球悬液，充分混匀后上样进行流式检测。为确保准确计数，最终流式上样检测管中的总体积应为精确的 1000ul。

3.制备单染管进行设备调节

四种单染对照，需要 2 管活菌悬液和 2 管死菌悬液，菌悬液按照步骤 2.1-2.5 进行染色，但每管菌悬液仅加一种染料，至少有一个单染管加入标准微球。

4. 流式细胞仪检测染色后的细菌

不同流式细胞仪在检测性能上存在差异，但是本试剂盒中建立的操作方法以及参数设定能够有助于实验人员在现有的实验条件下建立类似的细菌分析方法。

4.1 染色后的细菌可在配备 488nm 激光发射的流式细胞仪中进行检测。活死菌计数试剂盒中的荧光信号通过绿色和红色通道接收，可以分别用检测荧光素以及德克萨斯红（Texas Red）的滤光片。通过对数信号放大方式来进行前向散射、侧向散射和荧光信号的采集。

4.2 在检测细菌类似的相对小颗粒的时候，流式细胞仪参数设置对检测结果尤为重要。为了将电子噪声降到最低，请按照如下步骤设置仪器。单染管可以用来确定细菌群的位置以及调节荧光补偿。采用对数坐标收集信号，通过侧向散射来设定阈值，调节前向散射以及侧向散射信号使细菌群分布在数据图的中部，调节阈值来降低结果图中的电子噪声。为了检查是否排除电子噪声，可以短暂中断样品流，如果仪器调整正确，则信号速率应该降至接近零。设置绿色荧光通道的电压强度使被 meilungreen 染色的活菌分布在信号轴的顶部范围。如有必要，还可以调整补偿设置，使其位于红色荧光信号轴的较低范围内。接下来，设置红色通道的电压，使被 PI

（碘化丙啶）染色的死菌出现在信号轴顶部。如有必要，还可以调节补偿设置，使其位于绿色荧光信号轴的较低范围内。

4.3 按照以上步骤设定流式细胞仪后，可以开始检测对照组或者实验组的样品，包括被染色的细菌、标准微球，通过荧光信号对侧向散射的结果图展示细菌和微球的分布。数据采集过程中，通过荧光信号对侧向散射坐标图以及红色荧光对绿色荧光结果来展示活死菌以及微球的分布（图 1）。

4.4 通过测定微球分布区的事件数来精准判断检测上样量。试剂盒中的标准微球浓度为 1.0×10^{7} 个/ml，经过染色步骤的 50 倍稀释，上样检测中微球的浓度为 2.0×10^{5} 个/ml，因此，一个标准微球代表 5×10^{-6}ml。一个检测样品中细菌区域的事件数除以 5×10^{-6}ml 即为总细菌浓度，同样的死菌以及活菌的浓度即为相应区域的事件数除以 5×10^{-6}ml。计算培养体系中的细菌浓度，需要乘以稀释倍数，包括在步骤 2.3 中的 100 倍稀释，以及由于菌浓度过大而进行的进一步稀释。

$$\text{菌浓度} = \frac{\text{菌群分布区事件数}\times\text{稀释倍数}}{\text{微球分布区事件数}\times5\times10^{-6}} / \text{ml}$$

4.5 流式细胞检测中，仅通过细菌的大小和着色能力对其进行鉴定，最好再通过荧光显微镜确认检测到的颗粒确实是细菌。

4.6 需要注意，对于稀释过的细菌样品，采集时间需要相应延长，而且信号采集中细菌区域的噪点信号也可能会变得显著，此时对照组的结果可以用来评估噪点信号。

保存条件：

染料和标准微球悬液都需4℃避光保存。

注意事项：

1、染料管使用前需恢复至室温，并经过短暂离心后再开启。

2、不可冷冻标准微球。

3、染料有毒，须戴手套操作，做好安全防护。