

细菌活力/毒性检测试剂盒

Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Bacteria Cells



产品货号: L6060S, L6060L

产品规格: 20T, 100T

储存条件: -20°C避光保存, 有效期见外包装

应用范围: 细菌活力/毒性检测

组分信息

组分	L6060S (20T)	L6060L (100T)
A. NucGreen	20 μ L	100 μ L
B. EthD-III	40 μ L	200 μ L

产品参数

NucGreen: Ex/Em = 503/530 nm (结合 DNA)

EthD-III: Ex/Em = 530/620 nm (结合 DNA)

产品介绍

细菌活力/毒性检测试剂盒包含两种荧光染料, NucGreen 是绿色核酸染料, 可染色活细菌和死细菌; EthD-III 是红色核酸染料, 仅染色细胞膜受损的死细菌。将 NucGreen 和 EthD-III 适当混用, 具有完整细胞膜的细菌呈现绿色, 而具有受损细胞膜的细菌在不同通道下可分别呈现绿色和红色。

细菌活力的常见标准是生长测定, 生长测定是指细菌在合适的营养培养基中繁殖的能力。本试剂盒通常与细菌在液体或固体培养基中的生长测定结果有着很好的一致性。然而, 在某些条件下, 膜损伤的细菌可能会在营养培养基中恢复并繁殖, 而这种细菌在本测定中会被认定为死菌。相反, 一些具有完整膜的细菌可能无法在营养培养基中繁殖, 但在本测定中会被认定为活菌。因此, 若本试剂盒检测结果和细菌生长测定之间有较大的差异, 应考虑上述可能。

实验步骤

一. 活、死细菌样品对照制备 (可选)

1. 在液体培养基中培养4 mL的细菌至晚期对数期。
2. 在EP管中准备两份1 mL的细菌液, 并在5,000~10,000 g条件下离心10~15 min。
3. 去除上清液, 在其中一支EP管中加入0.3 mL的0.85% NaCl重悬细菌, 在另一管中加入1 mL的0.85% NaCl重悬细菌。
4. 在含有0.3 mL的0.85% NaCl的管中加入0.7 mL异丙醇, 充分混合 (最终浓度为70%的异丙醇) 用以制备死细菌样品。
5. 将两种样品在室温下孵育1 h, 每15 min混合一次。
6. 两种样品在5,000~10,000 g条件下离心10~15 min。



UElandy Inc.

Tel:0512-88965152

Web:www.uelandy.com

7. 去除上清，在两种样品中加入1 mL的0.85% NaCl重悬细菌，并如步骤6再次离心。
8. 使用分光光度计测定两种菌悬液在670 nm处的吸光值（OD670）。
9. 将两种菌悬液（活的和死亡的）密度调整到 10^8 个细菌/mL（OD670 \approx 0.3），然后用0.85%的NaCl以1:100稀释，使最终密度为 10^6 个细菌/mL。
10. 如下表所示混合两种菌悬液以获得所需的活细胞：死细胞比率。

表 1. 活、死菌悬液按一定体积混合以达到所需的活细胞、死细胞比例

活细胞：死细胞	活菌悬液体积（mL）	死菌悬液体积（mL）
0:100	0	1.0
10:90	0.1	0.9
20:80	0.2	0.8
30:70	0.3	0.7
50:50	0.5	0.5
100:0	1.0	0

二. 荧光显微镜观察的染色方法

1. 将1体积的A组分NucGreen和2体积的B组分EthD-III在微量离心管中混合，充分混合后加入8体积的0.85% NaCl溶液以得到100 \times 染料溶液。
2. 每100 μ L菌悬液，加1 μ L的100 \times 染料溶液。
3. 充分混合，室温下在黑暗中孵育15 min。
4. 孵育完成后，需进行漂洗，主要为了洗掉残留的染料；可先8000 rpm离心弃掉上清，然后用0.85%的NaCl漂洗2-3次，最后再用0.85%的NaCl重悬即可。
5. 取5 μ L染色后的菌悬液滴在带有18 mm方形盖玻片的载玻片上。
6. 在荧光显微镜下观察。活细菌和死细菌的荧光可以在任何标准的FITC长效过滤器下同时观察到。或者，活的（绿色荧光）和死的（红色荧光）细菌可以分别用FITC和Cy3（或Texas Red）通道观察。

注意：

- (1) 在对细菌染色之前，必须注意除去生长介质的残留。核酸和其他培养基组分可以以某种方式结合NucGreen和EthD-III染料，导致不可接受的染色变化。简单的洗涤步骤通常足以从细菌悬浮液中除去干扰介质组分。不建议使用磷酸盐缓冲液，因为它们会降低染色效率。
- (2) 在开始正式实验前应调节染料浓度来使NucGreen标记活细菌、使EthD-III标记死细菌进行区分。最佳浓度可能因细菌菌株的不同而异。一般最好使用能够提供充足信号的最低染料浓度。以上条件针对大肠杆菌活/死细胞染色进行了优化。

三. 流式细胞仪的染色方法

实验开始前，请阅读荧光显微镜染色步骤下的注意事项。

1. 根据表1，在EP管中加入11种不同比例的活细菌和死细菌。11种样品中每种的体积1 mL。
2. 将12 μ L的A组分NucGreen与24 μ L的B组分EthD-III在微量离心管中混合。11个样品中的每个加入3 μ L的混合染料，通过上



UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www.uelandy.com

下吹打几次彻底混合。（注意：需要准备另外的对照细菌样品用于单独的NucGreen和单独的EthD-III染色）

3. 室温下在黑暗中孵育15 min。
4. 孵育完成后，需进行漂洗，主要为了洗掉残留的染料；可先 8000 rpm 离心弃掉上清，然后用 0.85%的 NaCl 漂洗 2-3 次，最后再用 0.85%的 NaCl 重悬即可。
5. 使用流式细胞仪分析每个样品，使用 FITC 通道检测 NucGreen 阳性细胞的，使用 PI 或 PE 通道检测 EthD-III 阳性细胞。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 若使用孔板检测，可静置 10 min 后留少量菌液成像，能有效降低背景。
3. 为更接近真实结果，Merge 图片时建议保持红色荧光与绿色荧光亮度一致。
4. 荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
5. 请为了你的健康，操作过程中穿戴实验服和一次性手套。

