



## Viability/Cytotoxicity Kit for Bacteria Cells

(细胞活性和细胞毒性检测试剂盒)

产品货号	包装规格
<b>C032</b>	<b>1000</b> 次（荧光显微镜分析）； <b>200</b> 次（流式细胞仪分析）

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长(NM)：SYTO 9 dye: 480/500，结合到DNA中。Propidium iodide: 528/617，结合到DNA中。

## 产品说明书

晶科德生物科技（武汉）有限公司  
Jinkede Biotechnology(Wuhan) Co.,Ltd

邮编：430000

电话：400-662-6996

网址：[www.genecodex-bio.cn](http://www.genecodex-bio.cn)

## Viability/Cytotoxicity Kit for Bacteria Cells

货号：C032

## 试剂盒组分

组分	试剂名称	包装	储存条件
C032A	SYTO 9 dye	300 $\mu$ l, 3.34 mM	-20 $^{\circ}$ C, 避光保存
C031B	Propidium Iodide	300 $\mu$ l, 20 mM	-20 $^{\circ}$ C, 避光保存

## 产品介绍:

本试剂盒采用两种荧光探针：SYTO 9 dye 和 Propidium iodide，分别用来识别活细胞和死细胞。SYTO 9 dye 是一种检测活细胞和死细胞的绿色荧光染料，Propidium iodide 是一种检测死细胞的红色荧光染料。将这两种荧光染料以一定的比例混合，用于染色细胞群体，可以看到具有完整细胞膜的细菌细胞群发出绿色荧光信号，细胞膜受损的细菌群体发出红色荧光信号，可用于流式细胞仪、荧光显微镜或微孔板等其他荧光检测系统。本试剂盒的检测原理简单，应用于大多数的细菌细胞。

## 实验步骤

本实验步骤操作指南给科研工作者在研究细菌活性实验方面提供了一个实验案例。以下操作指南适用于革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌。

## 准备实验对照组（活、死细菌悬液）

**注意：**在进行细菌染色之前，小心移除细菌生长培养基，我们不推荐使用磷酸盐缓冲液，因为这种缓冲液可能会影响到细菌的染色效果。

- 1.1 收集 4 ml 生长到对数期的细菌培养液。
- 1.2 分别取 1 ml 细菌培养液加到两只 EP 离心管中，10,000  $\times$  g 离心 10~15 分钟。
- 1.3 小心移除上清，分别使用 0.3 ml 0.85% NaCl 和 1 ml 0.85% NaCl 溶液重悬细菌沉淀。
- 1.4 加入 0.7 ml 异丙醇到 0.3 ml 0.85% NaCl 细菌悬液的离心管中，混合均匀（异丙醇的终浓度为 70%），此步骤用于制备死细菌实验对照组。
- 1.5 将以上两组细菌样本置于室温环境，孵育 1 小时，每隔 15 分钟轻柔混匀一次。
- 1.6 10,000  $\times$  g 离心 10~15 分钟，弃上清，留细菌沉淀。
- 1.7 分别使用 1 ml 0.85% NaCl 溶液重悬细菌沉淀。
- 1.8 在 670 nm（OD670）波长下检测细菌光吸收密度值。
- 1.9 将制备的活细菌和死细菌悬液稀释到合适的浓度，用于以下染色实验中。

## 一、荧光显微镜分析

**注意：**本实验操作步骤提供 SYTO 9 dye 标记活细胞，Propidium iodide 标记死细胞，为了获得最佳的标记效果，建议根据不同的细胞类型，优化染色液的工作浓度。通常在获得较好的荧光信号的情况下优先选择最低的荧光染色液浓度。以下的实验步骤操作指南已经使用大肠杆菌活细菌、死细菌进行优化。

- 2.1 制备 100 $\times$ 染色混合液。在 1 只离心管中混合 1.5  $\mu$ l SYTO 9 dye 储存液和 1.5  $\mu$ l Propidium iodide 储存液，加入 7  $\mu$ l 0.85% NaCl 溶液，混合均匀。

- 2.2 分别准备 100  $\mu$ l 活细菌和死细菌悬液，加入 1  $\mu$ l 100 $\times$ 染色混合液，混合均匀。
- 2.3 室温孵育 15 分钟，注意避光。
- 2.4 分别吸取 5  $\mu$ l 细菌染色悬浮液到一个干净的载玻片上。
- 2.5 选取合适的滤光片，在荧光显微镜下进行观察。

### 滤光片的选取

SYTO 9 dye 和 Propidium iodide 这两种荧光染料可以使用长波通滤光片同时进行观察，也可以使用不同的滤光片分别进行观察。SYTO 9 dye 可选用 FITC 滤光片进行观察，PI 可选用 PI 或者 Texas Red 滤光片进行观察。SYTO 9 dye 和 PI 可选用的常用滤光片见表 1。

**表 1 SYTO 9 dye 和 Propidium iodide 适用的常用滤光片**

Omega 滤光器	Chroma 滤光器	备注
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	长波通滤光片同时观察 SYTO 9 dye 和 PI
XF22, XF23	31001, 41001	SYTO 9 dye 滤光片
XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 41004	PI 滤光片

### 二、微孔板分析

- 3.1 收集大肠杆菌或金黄色葡萄球菌细菌悬液，调整大肠杆菌菌液浓度约为  $2 \times 10^8$  cells/ml (OD670 约为 0.06)，金黄色葡萄球菌菌液浓度约为  $2 \times 10^7$  cells/ml (OD670 约为 0.30)。使用荧光微孔板进行分析时，金黄色葡萄球菌菌液浓度应少于大肠杆菌菌液浓度的 1/10。
- 3.2 按照表 2，制备 5 个大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的活细菌、死细菌不同浓度比例的菌液混合液，每管菌液样本为 2 ml。

**表 2: 活、死细菌混合液配比推荐表格**

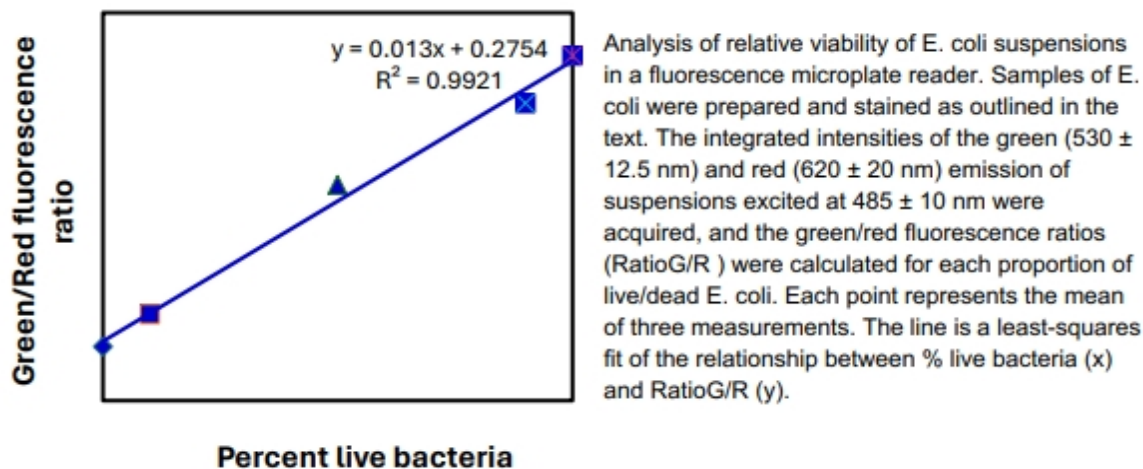
活、死细菌比例	活细菌悬液体积 (ml)	死细菌悬液体积 (ml)
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
50:50	1.0	1.0
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

- 3.3 制备细菌染色液：在 1 只离心管中混合 6  $\mu$ l SYTO 9 dye 储存液（组份 A）和 6  $\mu$ l Propidium iodide 储存液（组份 B）。
- 3.4 制备 2 $\times$ 细菌染色液：取 12  $\mu$ l 上述细菌染色液（步骤 3 中），加入 2 ml 去离子水中，混合均匀。
- 3.5 分别取 100  $\mu$ l 各个浓度的细菌混合液，到 96 孔微孔板中。建议每个细菌样本做三次重复。
- 3.6 使用新的移液枪头分别吸取 100  $\mu$ l 2 $\times$ 细菌染色液到每个细菌样本反应孔中，使用移液器吹打混匀数次。
- 3.7 室温孵育 15 分钟，注意避光。
- 3.8 在激发波长为 480 nm, 发射波长为 510 nm 的滤光片下，检测微孔板每孔的绿色光荧光值。
- 3.9 在激发波长为 480 nm, 发射波长为 630 nm 的滤光片下，检测微孔板每孔的红色光荧光值。

3.10 通过计算绿色荧光值与红色荧光值的比值来进行数据分析。

$$\text{Ratio}_{G/R} = F_{\text{cell,em1}} / F_{\text{cell,em2}}$$

3.11 绘制 RatioG/R 与大肠杆菌悬液中活细胞的百分比。



### 三、流式细胞仪分析

- 4.1 收集大肠杆菌细菌悬液，调整细菌浓度约为  $1 \times 10^8$  cells/ml (OD670 约为 0.03)，根据实验需要使用去离子水将细菌悬液进行 1 : 100 稀释，终浓度约为  $1 \times 10^6$  cells/ml.
- 4.2 按照表 3，制备 11 个活细菌、死细菌不同浓度比例的菌液混合液，每管菌液样本为 1 ml.
- 4.3 制备细菌染色液：在 1 只离心管中混合 20  $\mu$ l SYTO 9 dye 储存液 (组份 A) 和 20  $\mu$ l Propidium iodide 储存液 (组份 B)。上述制备的菌液样本中分别加入 3  $\mu$ l 细菌染色液，使用移液器吹打混匀数次。注意：建议准备额外的细菌样本，用于单独 SYTO 9 dye 储存液 (组份 A) 和单独 Propidium iodide 储存液 (组份 B) 的染色。
- 4.4 室温孵育 15 分钟，注意避光。
- 4.5 使用合适的激发波长，在流式细胞仪下进行分析。

表 3：活、死细菌混合液配比推荐表

活、死细菌比例	活细菌悬液体积 (ml)	死细菌悬液体积 (ml)
0:100	0	1.0
10:90	0.1	0.9
20:80	0.2	0.8
30:70	0.3	0.7
40:60	0.4	0.6
50:50	0.5	0.5
60:40	0.6	0.4
70:30	0.7	0.3
80:20	0.8	0.2
90:10	0.9	0.1
100:0	1.0	0