

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01073

产品介绍

NucGreen/EthD-III 活死细菌双染试剂盒 (绿色, 红色) 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。本试剂盒适用于大部分的细菌类型的染色, 可以用荧光显微镜或者流式细胞仪进行检测。NucGreen 和 EthD-III 的激发发射光谱请见产品参数。

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。本试剂盒的检测方法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。

应用范围

细菌活力、毒性检测

储运条件

-20 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

适用范围广: 适用于大部分细菌;

稳定性好: 荧光亮度强且抗淬灭性好且产品稳定, 易储存和运输;

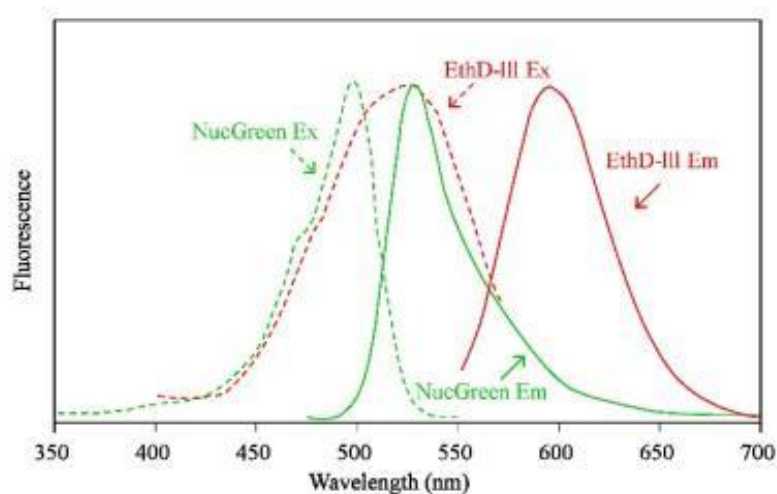
批间差小: 产品为公司自研, 批间差控制的好。

产品参数

NucGreen: Ex/Em: 503/530 nm (结合 DNA)

EthD-III: Ex/Em: 530/620 nm (结合 DNA)

光谱图:



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.在染色细菌前，请移除细菌培养液。可能细菌培养液中的组分或者游离核酸可能会被染料标记上造成背景。
- 3.建议染料用 0.85~0.9% 生理盐水稀释。PBS 或者 HBSS 稀释染料可能会影响染色效果。
- 4.具体的染料浓度和染色时间请根据具体的细菌样本进行条件优化。
- 5.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。
- 6.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。
- 7.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。
- 8.本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。
- 9.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
离心管
- 2.试剂
(1) 0.85% NaCl (2) 0.7 mL 异丙醇
- 3.仪器
(1) 分光光度计 (2) 荧光显微镜 (3) 流式细胞仪

操作步骤

- 1.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。
 - (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（六）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(OD 670)。
 - (9) 将两种菌悬液（活的和死亡的）密度调整到 10⁸ 个细菌/mL (OD 670 ≈ 0.3)，然后用 0.85% 的 NaCl 以 1: 100 稀释，使最终密度为 10⁶ 个细菌/mL。
 - (10) 如下表 1 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: 00	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

2. 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 × 染料溶液。
- (2) 每 100 μL 菌悬液，加 1 μL 的 100 × 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: 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。

3) 观察活细菌的两种颜色时, 请固定视野, 请不要挪动样本以及调整显微镜的细准焦螺旋, 否则造成视野错位, 影响结果。

3.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, 通过上下吹打几次彻底混合。

注: 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, 使用 PI 或 PE 通道检测 EthD-III 阳性细胞。