

Bacterial Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTO Live™ 9, PI, For Fluorescence Microscopy)

15 min 速染, 专为显微镜设计, 精准定性检测细菌死活, 适用范围广

产品货号: C20603

产品规格: 20 T, 100 T

储运条件: -20 °C避光保存, 冰袋运输

产品简介:

Bacterial Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTO Live™ 9, PI, For Fluorescence Microscopy)是一款专为细菌活力检测的荧光显微镜专用试剂盒, 以SYTO Live™ 9 绿色核酸染料和碘化丙啶(PI)红色荧光核酸染料为核心检测试剂, 利用两种染料光谱特征与细胞穿透能力的差异实现活菌与死菌的精准区分: SYTO Live™ 9 可对所有细菌进行染色, 而PI仅能穿透细胞膜受损的死菌。在死菌中, SYTO Live™ 9 的发射光可作为PI的激发光, 二者发生类似串联染料的FRET能量转移, 对SYTO Live™ 9 的绿色荧光产生淬灭效应, 因此死菌中观察不到SYTO Live™ 9 的绿色荧光。本试剂盒研发旨在解决传统细菌活力检测方法的诸多局限, 相较依赖代谢特征的检测法仅适用于少数细菌类群、膜完整性检测法存在高背景荧光的问题, 本产品不受细菌生长与染色条件的高度影响, 可在 15 min内对不同类细菌实现快速、可靠的活菌死菌定量区分, 实现不同环境条件下的最优染色效果, 检测结果精准且重复性好。

本试剂盒的研发依托不同细菌属在形态、细胞学和生理学上存在显著差异, 经全面实验验证, 可适用于蜡状芽孢杆菌、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、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等多种革兰氏阳性与革兰氏阴性细菌, 检测结果良好。本产品能通过荧光颜色直接区分活菌与死菌, 也可通过检测荧光比例推测样本中活菌与死菌的占比, 是科研人员开展细菌活力快速定性 & 精准定量检测的高效研究工具, 为各类细菌相关实验研究提供可靠的技术支撑。

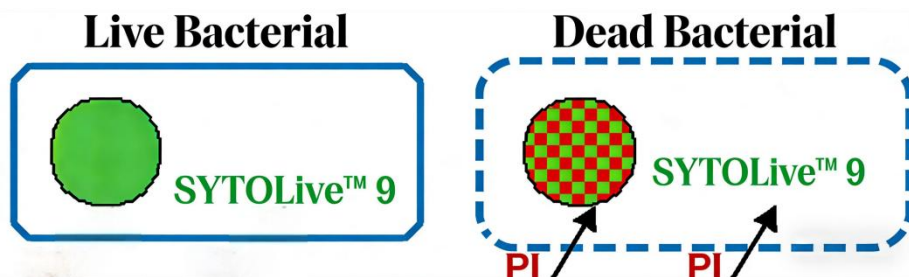


图 1. 染色工作原理图

注: 效能等同 Thermo Fisher LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kits(L7007)。

注: 本文中 LIVE/DEAD™ BacLight™ 为赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)的商标及注册商标。

应用范围: 细菌活力快速筛查、定量分析活菌比例、抗菌剂效果评估、微生物培养过程监测、细菌毒性与应激反应研究、水体/食品微生物污染快速筛查等

产品特点:

- **染色效率高:** 15 min 即可快速定量区分不同类型细菌中的活菌与死菌;
- **背景极低:** 染色完成后, 无需对菌液进行洗涤处理, 检测背景基本无荧光干扰;
- **窄谱强信号:** SYTO Live™ 9 比进口 Bio*DMAO, 光谱范围更窄更集中、多色实验兼容性好、信号稳定性更强;
- **适用范围广:** 可用于蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等多种革兰氏阳性与革兰氏阴性细菌, 检测结果良好;
- **高通量检测:** 可满足大批量样本的规模化、高通量检测需求, 适配批量实验场景。



产品组分：

组分	20 T	100 T
A. SYTOLive™ 9/PI Dye Mixture 1	30 µL	150 µL
B. SYTOLive™ 9/PI Dye Mixture 2	30 µL	150 µL

注：使用次数以染料添加量依据实验体系比例计算，即每 1 mL 细菌悬液对应加入 3 µL 染料混合液。

注：将组分 A 与组分 B 按 1：1 体积混合后，染色效能与 Universal Bacterial Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTOLive™ 9, PI)(C20604)一致。

注意事项：

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- PI具有诱变性及毒性，DMSO为有机溶剂，操作时均应采取相应防护措施。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避免。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：
一、实验前准备
1. 试剂准备：

- 将试剂盒各组分恢复至室温，准备足量0.85% NaCl缓冲液。
- 染色混合液配制：

样品数量	1	5	10
A. SYTOLive™ 9	1.5 µL	7.5 µL	15 µL
B. PI	1.5 µL	7.5 µL	15 µL
Dual-Stain Mixture	3 µL	15 µL	30 µL

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：激发/发射波长Ex/Em：480/500 nm(SYTOLive™ 9)、Ex/Em：490/635 nm(PI)；

3. 对照组设置：

组别	SYTOLive™ 9	PI	样品细胞
阴性对照	+	+	不做任何处理
实验组	+	+	实验组细菌

- 阴性对照组：排除染料的非特异性结合，验证染色的特异性。

4. 细菌准备：

- 根据实验设计，对细菌进行相应的实验处理。

二、操作步骤（以大肠杆菌为例-荧光显微镜检测）
1. 接种与培养：

- (1) 在超净工作台内，取无菌培养管，将菌液接种至 LB 培养基中。
- (2) 放于 37 °C培养箱震荡培养生长至对数生长后期。

2. 收集与洗涤细菌：

- (1) 将细菌悬液置于离心管中，10000× g 离心 10 min，小心吸弃上清液，取 0.85% NaCl 溶液重悬。
- (2) 用 0.85% NaCl 溶液洗涤细菌悬液 1~2 次，操作同上。

注：细菌悬液洗涤过程中，不建议使用磷酸盐缓冲液，磷酸盐成分会降低 SYTOLive™ 9 与 PI 的染色效率，导致细菌染色效果不佳、荧光信号异常，影响活菌与死菌的荧光判别结果。

3. 制备死细菌悬液：


仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
 英文网址 www.probelives.com
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

(1) 将细菌悬液置于离心管中，于 95 °C 水浴锅 5 min，获得死细菌悬液。

(2) 可按照所需实验目的，按比例混合活死细菌。

注：本方法为灭活处理参考方案，仅供参考，实际实验中可根据研究需求调整，或参照相关文献优化处理条件。

4. 细菌重悬与计数：

(1) 取菌液测定 670 nm 的光密度(OD₆₇₀)。

(2) 使用 0.85% NaCl 溶液将细菌悬液稀释 OD₆₇₀ 到 0.03~0.15 左右。

注：稀释范围仅供参考，显微镜法对细菌密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细菌分布清晰可辨为宜。

5. 细菌染色：

(1) 在离心管内，将组分A (SYTO Live™ 9/PI Dye Mixture 1)和组分B (SYTO Live™ 9/PI Dye Mixture 2)按1：1的体积比混匀得到染料混合液。

(2) 取1 mL细菌悬液，加入3 μL上述染料混合液，轻柔混匀。

(3) 室温避光孵育15 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为15~30 min。

注：试剂盒中 SYTO Live™ 9 与 PI 染料经平衡优化，1：1 体积比混合可满足绝大多数样本的活菌/死菌荧光区分需求。

注：特殊情况下，若特殊菌株染色效果不佳，可通过查阅文献优化实验步骤进行优化。

注：染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细菌种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

6. 收集与重悬：

(1) 孵育结束后，10000× g 离心 10 min，收集细菌。

(2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。

(3) 用 400 μL 0.85% NaCl 溶液重悬细菌，制成待测样品。

注：细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%-80% 为最佳。

7. 显微镜观察与拍照：

(1) 载玻片法：取5 μL细菌悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。

(2) 分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

注：针对观察过程中可能出现的样本漂移或干燥问题，可自备封片油，直接滴加于染色后的菌液表面，以实现细菌固定与样本保湿，确保成像稳定清晰，该试剂仅限封片使用，严禁用作浸油。

三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

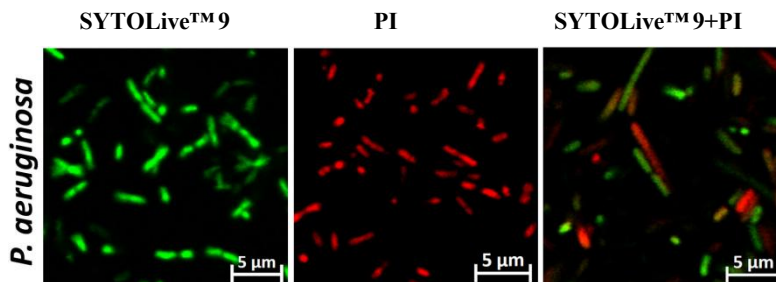


图 2. *p.aeruginosa* 染色效果荧光显微镜图

结果判读：在细菌生物膜实验中，SYTO Live™ 9 与 PI 联合染色时，活细菌和死细菌信号清晰分离，无背景干扰。

注：图片引自参考文献《CAM/TMA-DPH as a promising alternative to SYTO9/PI for cell viability assessment in bacterial biofilms》(doi: 10.3389/fcimb.2024.1508016.)

常见疑问与解答：

● 问：如何制备死细菌悬液？

答：具体灭活处理参考方案，在实际实验中可根据研究需求调整，或参照相关文献优化处理条件。

● 问：使用SYTO Live™ 9与PI进行细菌死活检测时，厌氧环境是否会对实验结果产生不利影响？

答：氧含量不会影响 SYTO Live™ 9 与 PI 与核酸的结合。SYTO Live™ 9 可标记所有细菌，PI 仅标记细胞膜受损的细菌。

● 问：能否使用本试剂盒对已被真核细胞吞噬的细菌进行死活染色？

答：不可以。SYTO Live™ 9 会对真核细胞的细胞核进行染色，无论其死活；而 PI 无法穿透活的真核细胞膜。若真核细胞死亡，PI 会进入并同时标记真核细胞与细菌，无法区分；若真核细胞存活，PI 无法进入，无论细菌死活均不能被染



色。

- 问：我司提供两款产品之间有什么区别，该如何选用？

答：我司提供两款产品，产品的区别与优势及如何选用可参考下表：

产品货号	C20603	C20604
染料形式	预混液 A+B	液体单组分 SYTOLive™9、PI
操作特点	简单，用预混液	灵活，可调染料比例
溶剂安全性	DMSO	DMSO
仪器	专为荧光显微镜设计	荧光显微镜/荧光酶标仪/荧光光度计/流式细胞仪
用途	定性	定性+定量
优势	直接取用混合液，步骤简单	定量准、配比可调、多仪器兼容

