

Universal Yeast Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTO Live™ 9, PI)

最快 15 min 速染，精准定性定量检测酵母死活，操作简单灵活，适用范围广

产品货号：C20606

产品规格：30 T, 150 T

储运条件：-20 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

Universal Bacterial Biofilm Live/Dead Viability Assay Kits (SYTO Live™ 9, PI)是专为酵母及真菌类细胞量身打造的双荧光死活细胞精准分型检测试剂盒，可高效、稳定、定量地完成酵母活率判定、细胞毒性评价。试剂盒核心组分为绿色荧光核酸染料SYTO Live™ 9 与红色荧光核酸染料碘化丙啶(PI)，两种染料凭借差异化的细胞膜穿透能力与核酸结合特性，以细胞膜完整性为金标准，实现活酵母与死酵母的特异性区分。酵母的存活状态直接由细胞膜结构完整性决定，是反映细胞代谢活性、生理功能与损伤程度的关键指标。活酵母细胞膜结构完整，可维持胞内稳态并阻挡外源大分子进入；死细胞或濒死细胞则因药物作用、环境胁迫、代谢衰竭等造成细胞膜破损，丧失屏障功能，胞内物质外泄且外源物质可自由进入。本试剂盒基于这一核心生物学特性设计：

(1) SYTO Live™ 9 具备良好细胞膜通透性，可进入所有酵母细胞并与核酸特异性结合，发出稳定明亮的绿色荧光。

(2) PI为膜非通透性红色荧光染料，分子体积大，无法穿透完整细胞膜，仅能进入膜破损的死细胞，与核酸结合后发出强红色荧光。

当两种染料联合使用时，PI对核酸的结合亲和力更高，可通过竞争性结合与荧光共振能量转移(FRET)效应淬灭死细胞内SYTO Live™ 9 的绿色荧光，最终实现活酵母呈绿色荧光、死酵母呈红色荧光的清晰区分，结果直观易判、定量准确。相较于传统平板计数法估测法等耗时长、主观性强、定量不准、安全性偏低的检测手段，本试剂盒具备操作快捷、灵敏度高、荧光信号强、背景干扰低、结果客观定量等显著优势，可完美适配流式细胞术、荧光显微镜、荧光微孔板读板仪等多平台检测，广泛应用于抗真菌药物筛选、细胞毒性评估、凋亡检测、环境胁迫应答、发酵工艺监测及酵母细胞生物学基础研究，全面满足科研与工业场景对酵母活力快速精准检测的核心需求。

本试剂盒采用即用型染料溶液配制，无需繁琐配制与脱色洗涤，染色后可直接上机或镜检，全程仅需 15 min即可完成检测，大幅降低实验操作门槛与时间成本，有效避免培养基成分、杂质颗粒与非特异性染色带来的干扰。依托高灵敏度与高特异性的双荧光染色体系，试剂盒不仅能精准测定酵母活率，还可定量评估药物、胁迫因子、理化处理等对细胞的损伤程度，为抗真菌药物研发、病原真菌机制研究、工业发酵质控、食品微生物安全评价、细胞毒性与凋亡分析提供稳定、可靠、可重复的定量检测手段，以标准化实验方案助力科研人员高效获取准确数据，为生命科学基础研究、药物开发与工业微生物应用提供关键技术支持与科学依据。

注：效能等同Thermo Fisher LIVE/DEAD™ FungaLight™ 酵母细胞活力检测试剂盒(L34952)。

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

应用范围：酿酒酵母、毕赤酵母、假丝酵母等各类真菌的活/死细胞比例快速测定、抗真菌药物筛选与效价评价、细胞毒性与胁迫损伤分析

产品特点：

- **染色效率高：**15 min 即可快速定量区分不同类型酵母中的活菌与死菌；
- **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：**酿酒酵母、毕赤酵母、假丝酵母等各类真菌的活/死细胞比例快速测定，检测结果良好；
- **双重检测功能：**定性定量一体化，可通过荧光颜色直接区分活菌死菌，也可通过荧光比例精准测算活菌死菌占比；



- **试剂灵活可调：**单组分染料独立分装，配比可灵活微调，支持荧光校准，适配多样环境条件。

产品组分：

组分	30 T	150 T
A. SYTOLive™ 9	30 μ L	150 μ L
B. PI	30 μ L	150 μ L

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 酵母悬液对应加入 2 μ L 染料混合液。

注意事项：

- 开启小瓶前，请先将各化合物恢复至室温。DMSO溶液会吸收水分，可能导致染料活性降低。SYTOLive™ 9染料的DMSO母液应密封干燥保存，并在短期内使用完毕。首次使用时，可按单次使用量对SYTOLive™ 9与PI进行分装保存。
- 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，请尽量注意避光。
- 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 μ L	5 μ L	10 μ L
B. PI	1 μ L	5 μ L	10 μ L
Dual-Stain Mixture	2 μ L	10 μ L	20 μ L

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)；
- 荧光酶标仪：激发/发射波长Ex/Em：480/500 nm(SYTOLive™ 9)、Ex/Em：490/635 nm(PI)；
- 流式细胞仪：检测通道激发/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
空白对照	-	-	不做任何处理
阴性对照	+	+	不做任何处理
单阳对照 1	+	-	活酵母悬液
单阳对照 2	+	-	灭活酵母悬液
单阳对照 3	-	+	活酵母悬液
单阳对照 4	-	+	灭活酵母悬液
实验组	+	+	实验组酵母

- 空白对照组：评估背景荧光干扰、检测酵母自身的自发荧光、流式检测中用于调节阈值和电压。



- 阴性对照组：排除染料的非特异性结合，验证染色的特异性。
- 单阳对照组：排除荧光串扰，校准信号强度参数、流式检测中调节补偿。

4. 酵母准备：

- 根据实验设计，对酵母进行相应的实验处理。
- 灭活酵母悬液制备：将酵母悬液置于离心管中，于 95 °C 水浴锅 5 min，获得死酵母悬液。

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。

二、操作步骤（以酿酒酵母为例）

方案一：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，将菌液接种至酵母培养基中。
- (2) 放于培养箱震荡培养。

2. 收集与洗涤酵母：

- (1) 将酵母悬液置于离心管中，10000× g 离心 10 min，小心吸弃上清液，取 0.85% NaCl 溶液重悬。

注：使用本试剂盒试剂对酵母细胞染色前，需彻底去除培养液残留，因培养液中的核酸及其他组分可能与 SYTO Live™ 9 染料、PI 发生非特异性结合，导致染色结果出现不可控的偏差。

- (2) 用 0.85% NaCl 溶液洗涤酵母悬液 2 次，操作同上。

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

3. 酵母重悬与计数：

- (1) 0.85% NaCl 溶液重悬酵母沉淀。用血球计数板进行计数，调整浓度至适宜水平（推荐浓度 1×10^6 个/mL）。

注：稀释范围仅供参考，显微镜法对酵母密度要求不严格，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，以显微镜下视野中酵母分布清晰可辨为宜。

4. 酵母染色：

- (1) 在离心管内，将组分 A (SYTO Live™ 9) 和组分 B (PI) 按 1 : 1 的体积比混匀得到染料混合液。
- (2) 取 1 mL 酵母悬液，加入 2 μL 上述染料混合液，轻柔混匀。
- (3) 37 °C 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酵母样本的活菌/死菌荧光区分需求。特殊情况下，可根据实际检测需求调整染料混合比例。若样本中绿色荧光信号过强，可通过降低 SYTO Live™ 9 浓度或提高 PI 浓度优化染色效果。

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

5. 收集与重悬：

- (1) 孵育结束后，10000× g 离心 3 min，收集酵母。
- (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 溶液重悬酵母，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。

6. 显微镜观察与拍照：

- (1) 载玻片法：取 5 μL 酵母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) 取 50 μL 重悬后的菌悬液加入 96 孔板中，静止 10 min，在荧光显微镜下观察荧光染色效果。
- (3) 分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

方案二：流式细胞仪检测

1. 接种与培养：

- (1) 在超净工作台内，取无菌培养管，将菌液接种至酵母培养基中。
- (2) 放于培养箱震荡培养。

2. 收集与洗涤酵母：

- (1) 将酵母悬液置于离心管中，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 溶液洗涤酵母悬液 1~2 次，操作同上。

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



3. 酵母重悬与计数：

(1) 0.85% NaCl 溶液重悬酵母沉淀。用血球计数板进行计数，调整浓度至适宜水平（推荐浓度 1×10^6 个/mL）。

4. 酵母染色：

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

(2) 取1 mL酵母悬液，加入2 μ L上述染料混合液，轻柔混匀。

(3) 37 °C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酵母样本的活菌/死菌荧光区分需求。特殊情况下，可根据实际检测需求调整染料混合比例。若样本中绿色荧光信号过强，可通过降低 SYTO Live™ 9 浓度或提高 PI 浓度优化染色效果。

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

5. 收集与重悬：

(1) 孵育结束后，10000× g 离心 10 min，收集酵母。

(2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。

(3) 用 400 μ L 0.85% NaCl 溶液重悬酵母，制成流式上机样品。

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。

6. 上机检测：

(1) 重要：染色完成后1 h内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。

(2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

(3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。

(4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。

(5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

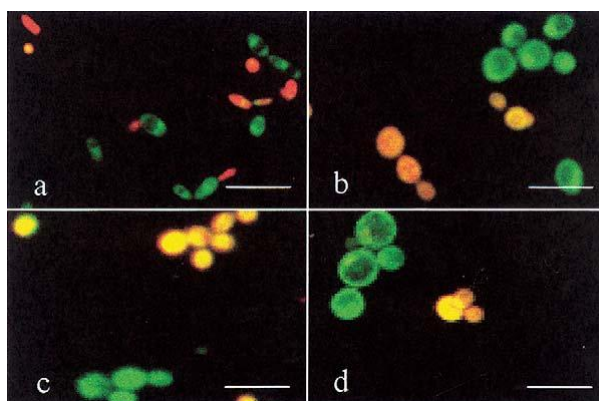


图 1.经 SYTO Live™ 9 与 PI 染色的活/死酵母细胞荧光成像图

结果判读：(a)马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；(b)巴斯德毕赤酵母 (*S. pastorianus*，也常称巴氏酵母)；(c)酿酒酵母 (*S. cerevisiae*，菌株号 DSM70424)；(d)酿酒酵母 (*S. cerevisiae*，菌株号 DSM70449)，在酵母测试实验中，SYTO Live™ 9 与 PI 联合染色时，活酵母和死酵母信号清晰分离，无背景干扰。

注：图片引自参考文献《Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight》(DOI: 10.1023/b:bile.0000030045.16713.19.)



2. 定量分析（流式细胞仪）：

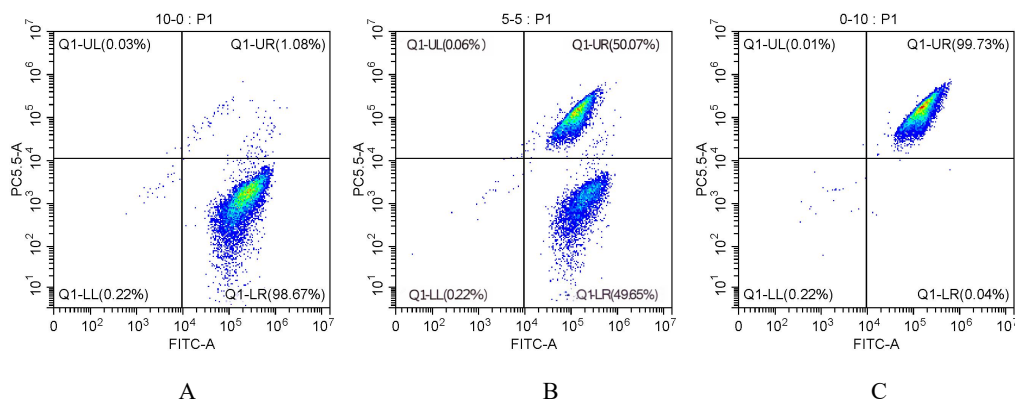


图 2.酵母流式分析图

结果判读：将酵母菌经过高温灭活处理后，与活酵母按照不同比例混合，如：活：死=10：0、5：5、0：10 三种不同比例混合后，经 SYTO Live™ 9 与 PI 染色后，通过流式细胞术检测，结果表明：如图 B 右下代表活菌，右上为死菌。表明试剂盒可将活死菌精准区分。

常见疑问与解答：

- 问：如何制备死酵母悬液？

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 进行酵母死活检测时，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 可标记所有酵母，PI 仅标记细胞膜受损的酵母。

- 问：能否使用本试剂盒对已被真核细胞吞噬的酵母进行死活染色？

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酵母，无法区分；若真核细胞存活，PI 无法进入，无论酵母死活均不能被染色。

