

Ethidium Monoazide Bromide (EMA)

10 min 光激活修饰，特异性区分活死菌，可用 DNA 功能研究

产品货号：M10506

产品规格：5 mg

储运条件：4 °C避光保存；冰袋运输

产品简介：

Ethidium Monoazide Bromide (EMA, 叠氮溴化乙锭)，是一种对DNA具有高亲和性的结合染料。由于EMA对活细胞的通透性相对较低，可特异性标记死细胞内的DNA，染料作用后经光解处理，可使死细胞DNA与染料形成共价结合。EMA的核心优势是对活细胞细胞膜通透性低，经光激活后经 10 min 孵育即可特异性修饰死菌DNA。能高效区分活死细胞，且干扰活菌检测，兼容qPCR精准定量，广泛适用于细菌样本检测。

作为早期开发的活死细胞区分关键工具，EMA为微生物学检测与细胞生物学研究提供了突破性技术支撑。传统分子生物学检测技术局限性在于区分死细菌和活细菌周期长，容易高估了样品中存在的细胞数量的背景下，EMA通过标记死细胞DNA的机制，实现了混合体系中活死细胞的高效分离与检测，简化了实验操作流程，降低了生物安全风险，推动了微生物质控、检验临床诊断相关研究的精准化发展。

注：别名Ethidium Monoazide Bromide；

注：效能等同Biotium Ethidium Monoazide Bromide(EMA)；

应用范围：细菌活死状态鉴定，简单体系中活性微生物的定性分析，DNA 足迹分析，修饰质粒 DNA 等；

产品特点：

- **qPCR 兼容：**10 min 修饰死菌 DNA，准确区分活死细胞，不干扰活菌检测，避免传统镜检假阴性；
- **特异性高：**几乎无法穿透活细胞膜，能特异性结合死细胞或细胞膜受损细胞的核酸；
- **高效的光反应活性：**光照下迅速光解生成高活性氮宾中间体，与核酸共价结合，稳定标记目标核酸；
- **强荧光增强：**相与核酸结合后荧光强度急剧提升，较于 PMA 非 qPCR 荧光观察场景适配性更优；
- **应用场景广泛：**涵盖质粒 DNA 修饰、DNA 足迹分析、活死细菌区分等。

产品参数：

- **外观：**可溶于乙醇或 DMSO 的橙色固体；
- **Ex (pH3)：**458 nm；
- **Ex/Em：**510/600 nm(after photocrosslinking to nucleic acid)；
- **CAS 号：**58880-05-0；
- **分子式：** $C_{21}H_{18}BrN_5$ ；
- **分子量：**420.31；

产品组分：

组分	1200 T
A. Ethidium Monoazide Bromide (EMA)	5 mg

注：1200 T 为试剂盒组分 A 以 25 μ M 进行反应的总数。



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。
- 本产品推荐浓度为10-200 mg/L, 在正式实验前, 建议进行预实验, 确定最佳的实验参数。
- EMA对光敏感, 应在避光条件下储存和操作。使用过程中, 尽量减少光照时间, 避免EMA提前激活, 影响实验结果。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- EMA具有一定的毒性, 操作时请佩戴手套、护目镜等防护装备, 避免皮肤接触和吸入。
- 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:**

- 储备液制备: 在组分A (Ethidium Monoazide Bromide ,EMA)中添加595 μ L超纯水, 充分涡旋混匀, 配制成20 mM的EMA储备液。

注: 储备液配置完成后建议分装后, -20 $^{\circ}$ C避光保存, 避免反复冻融。

2. 仪器准备

- RT-PCR 仪;
- 蓝光照射灯。

3. 菌液准备

- 菌液制备: 将菌液接种至液体LB培养基, 放入摇床培养箱培养至OD₆₀₀≈1.0。

注: 培养基种类和培养时长可依据实验情况调整。

4. 对照设置

- 活细菌空白对照组: 不加 EMA;
- 活细菌对照组: 加入 EMA;
- 死细菌对照组: 加入 EMA;
- 死细菌空白对照组: 不加 EMA;
- 实验组: 加入 EMA/不加 EMA 各做检测。

二、操作步骤**1. 细菌处理:**

- (1) 取两份 400 μ L 活细菌, 分别置于洁净的离心管中。
- (2) 若需死细菌作为对照 (可选), 可将活细菌放入水浴锅, 选择 95 $^{\circ}$ C加热 5 min, 或 58 $^{\circ}$ C加热 3 h, 具体依样本而定, 处理后即得死细菌, 后续操作与活细菌一致。

2. 染色

- (1) 两份活细菌, 一份不做 EMA 处理, 另一份 25 μ M EMA 处理。

注: 处理不同类型或来源细菌的最佳 EMA 浓度, 需查阅相关文献并设计预实验。

- (2) 将经 EMA 处理的样本置于室温摇床上, 避光孵育 10 min, 让染料与样本充分混合。
- (3) 对样品进行蓝光照射, 例可使用 60 W 蓝光灯照射 15 min。若使用卤素灯, 建议将 EMA 处理后的样本管放置在距离光源 20 cm 处的冰块上, 冰块置于透明托盘中, 调整光源直射样品, 光解 5-15 min; 若直接使用从环境获取的细菌实验, 鉴于环境样本的复杂性和浑浊度, 需适当延长光解时间。

注: 照射时长仅提供参考。

3. 基因组 DNA 提取

- (1) 将处理和未处理的活细菌以 5000 $\times$ g 的转速离心 10 min, 去除上清液。
- (2) 根据样本类型选择合适的基因组 DNA 提取试剂盒, 洗脱 DNA 时, 各组样本使用相同的洗脱体积。DNA 提取步骤参照所用试剂盒说明书。

注: EMA 的作用机制之一是通过沉淀去除样本中结合的 DNA, 所以提取基因组 DNA 时, 各组需用相同体积的洗脱液进行体积归一化处理 (由于死菌和活菌提取的基因组 DNA 量不同, 两者浓度差异显著)。



4. 按如下体系制备反应混合液

反应组分	20 μL 反应体积	终浓度
(自备) qPCR Mix	—	1×
F,R 引物	适量	各 0.4 μM
模板	适量	—
H ₂ O	补足至 20 μL	—

5. 测试程序：根据自备 qPCR Mix 进行程序设定。

注：建议先对引物及 qPCR 程序的适用性进行验证。

三、结果判读：

- 以活细菌和死细菌作为对照，分析计算样本中的活细胞数量。

1. 计算死、活细菌对照 dCt

(1) qPCR 实验结束后，用仪器自带软件计算每个样本的 Ct 值。

(2) 通过计算每个对照细菌的 dCt 来判断 EMA 是否成功抑制了死细菌 DNA 的扩增，计算如下：

$$dCt_{\text{活}} = Ct_{(\text{活}, \text{EMA 处理})} - Ct_{(\text{活}, \text{EMA 未处理})}$$

$$dCt_{\text{死}} = Ct_{(\text{死}, \text{EMA 处理})} - Ct_{(\text{死}, \text{EMA 未处理})}$$

(3) 活细菌 dCt 预期值接近 0±1，这意味着 EMA 不会干扰活细胞 DNA 的扩增。

(4) 死细菌的 dCt 预期值大于 4（dCt 为 4 时，代表死细菌 DNA 减少约 16 倍，即去除了 94%；dCt 为 8 时，减少约 250 倍，即去除了 99.6%）。

注：死细菌的 dCt 受多种因素影响，包含菌株系/细胞类型、细菌致死方式、EMA 使用浓度以及扩增序列长度。

2. 计算活细菌占比

- 当死、活细菌对照结果无异常，即可开展样本中活细菌占比的计算。

(1) 样本 dCt 值的计算：

$$dCt_{\text{样本}} = Ct_{(\text{样本}, \text{EMA 处理})} - Ct_{(\text{样本}, \text{EMA 未处理})}$$

(2) dCt 值转换为活细菌比例：

$$\text{EMA 抑制倍数} = 2^{(\text{样本 } dCt)}$$

$$\text{活细菌}\% = 100 / \text{EMA 抑制倍数}$$

3. 活细菌绝对数量的计算

- 若要计算样本中活细菌的绝对数量，需用已知数量的目标菌基因组 DNA 绘制标准曲线。建议将几组基因组浓度稀释至 qPCR 分析体系的有效范围内。

(1) 制作标准曲线，细胞数为横坐标，Ct 值为纵坐标。

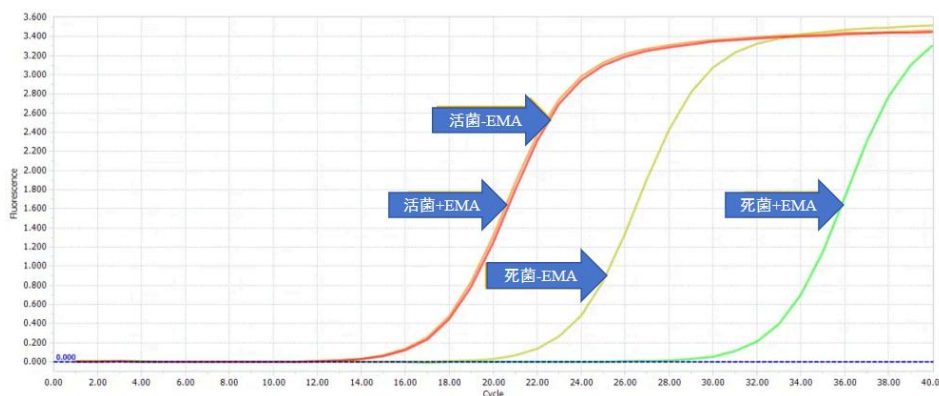
(2) 实验样本拷贝数的计算：

$$Ct = \text{斜率} \times \text{细胞数} + y \text{ 轴截距} (y = mx + b)$$

$$\text{细菌数}_{\text{样本}} = (Ct - y \text{ 轴截距}) / \text{斜率}$$

注：纯化过程中活细菌 DNA 未损失。

示例：下图，活/死大肠杆菌用 25 μM EMA 孵育后光解处理，然后提取 gDNA，采用 uidA 引物进行扩增。



注：因不同仪器不同菌群检测结果会有差异，此结果仅供参考。



常见疑问与解答：

- 问：死菌与活菌dCt小于1，可能是什么情况导致？

答：原因如下，

a.两个样本的 Ct 值均偏低，暗示所采用的杀菌条件可能未能达到理想效果，导致细菌未能彻底凋亡。而在 95 °C 的高温加热处理下，几乎可以确信，细菌的细胞膜将遭受严重破裂，从而达到彻底灭菌的目的。

b.这两个样本的 Ct 值均偏高（Ct 值超过 30），这或许表明您的细菌样本曾经经历过冷冻过程，导致活菌的细胞膜受到损伤，从而影响了检测结果的准确性。

- 问：EMA跑HPLC为什么会出现双峰？

答：由于本产品的特殊合成工艺，往往会导致同分异构体的生成，这些异构体之间在极性上存在微妙差异，从而在液相色谱分析中呈现出独特的双峰现象。尽管如此，经过我司严谨的科学验证，这两种同分异构体的 EMA 在生物活性上表现出了惊人的一致性——它们均能高效抑制死菌，且在抑制效率上毫无二致，确保了产品的卓越性能与稳定性。

- 问：为什么光照交联最好选择蓝灯？

答：在蓝光的照射下，光解效率显著提升。EMA 分子中的光反应性叠氮基团，在蓝光（波长约为 464 nm）的精准激活下，蜕变为一群高活性的氮烯自由基。这些如同勇士般的自由基，勇猛地搜寻并锁定 DNA 结合位点周边的烃基部分，与之激烈碰撞，进而铸就出坚固稳定的共价氮碳键。这一过程，无疑是 EMA 与 DNA 实现深度交联的核心环节，它不仅揭示了分子间的互动奥秘，也开启了光化学反应的新篇章。

