

Propidium Monoazide Bromide (PMA)

10 min 特异永久修饰死菌 DNA，qPCR 兼容，水溶性佳，无毒无漏检，多样本适用

产品货号：M10507

产品规格：1 mg

储运条件：4 °C避光保存；冰袋运输

产品简介：

Propidium Monoazide Bromide (PMA, 叠氮溴化丙锭) 是可以精准区分活菌与死菌DNA的光敏性染料。PMA对双链DNA具有高亲和性，自身荧光微弱，与核酸结合后荧光信号显著增强。其核心作用原理为PMA无法穿透完整细胞膜，仅能特异性进入细胞膜受损的死细胞内与DNA结合，在蓝光照射下，PMA的光反应性叠氮基会转化为高活性氮烯自由基，与DNA结合位点附近烃基形成稳定共价氮碳键，实现DNA的永久修饰，从而有效阻碍死细胞中DNA的PCR扩增。而未结合的PMA在强光下会与水反应分解为无交联活性的羟胺，从而阻止PMA与细菌基因组DNA提取过程中暴露的活菌DNA发生交联反应，避免发生漏检现象。本产品核心优势为PMA的水溶性佳、操作简便且无细胞毒性，经 10 min 孵育即可特异性修饰死菌DNA，与DNA形成不可逆共价结合，阻断PCR扩增能力及死菌DNA去除率均显著优于EMA，能高效区分活死细胞，且不干扰活菌检测，兼容qPCR精准定量，广泛适用于细菌、酵母等多类微生物及粪便、土壤、食品等复杂样本检测。

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，复杂样品背景差，容易高估了样品中存在的细胞数量。PMA可以修饰死菌，精准保留活菌DNA的扩增活性，为活性微生物的定量与群落分析提供可靠依据。该技术不仅推动了微生物生态学中活性菌群功能解析的研究深度，为环境物质循环、微生物互作等机制研究提供了精准工具，还在食品益生菌活菌定量、临床致病菌快速检测等实际应用场景中实现了技术突破。

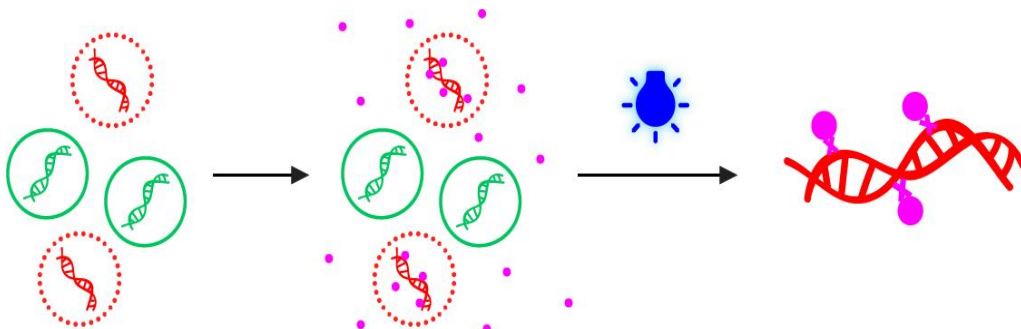


图 1.PMA结合死菌DNA示意图

注：别名Propidium Monoazide；

注：效能等同Biotium PMA(Propidium Monoazide)。

应用范围：细菌、酵母、真菌、病毒活死状态鉴定，活性微生物的精准定量与群落分析，土壤、水体、粪便等环境中活性微生物群落结构，食品致病菌残留，益生菌活菌计数，生物膜活性微生物检测等；

产品特点：

- **精准活死区分，不扰活菌：**仅结合死菌 DNA，不扰活菌代谢（可后续培养），定量准确率提升 30%+，久经验证；
- **PCR 抑制效能标杆：**死菌 DNA 去除率优于传统 EMA，高浓度死菌样品定量偏差 <5%，杜绝假阳/假阴性；
- **厚壁微生物适配性强：**成熟穿透技术，轻松解决革兰氏阳性菌、真菌等难破壁微生物活死区分痛点；
- **10 min 快速修饰：**无需复杂前处理，四步标准化流程，10 min 即可完成死菌 DNA 特异性修饰，适配批量检测；
- **多平台兼容，信号稳定：**适配 PCR 等传统及主流平台，荧光信号稳定，实验重复性高；
- **水溶性佳，安全便捷：**无需有机溶剂辅助溶解，操作简便且无细胞毒性干扰，降低实验风险；



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 Probilives Technology CO., LTD.

- **应用场景全面覆盖：**覆盖细菌、酵母、真菌、寄生虫等微生物，适配粪便、土壤、食品、临床感染样本等复杂样本。

产品参数：

- **外观：**可溶于水或 DMSO 的红色固体；
- **Ex：**464 nm(before photolysis)；
- **Ex/Em：**510/610 nm(following photolysis and reaction with DNA/RNA)；
- **分子式：** $C_{27}H_{32}Cl_2N_6$ ；
- **分子量：**511.5；

产品组分：

组分	200 T
A. Propidium Monoazide Bromide (PMA)	1 mg

注：200 T 为试剂盒组分 A 以 25 μ M 进行反应的总数。

注意事项：

- **适用范围与前期验证：**PMA 能根据细胞膜的通透程度区分死菌和活菌。多数杀菌方式会破坏细胞膜，适用于 PMA 检测，但紫外线照射等可能不会立即导致细胞膜破裂，存在假阳性风险。因此在使用 PMA 检测前，须进行文献查阅和预实验，确认其适用于所选细菌种类和杀菌方法。
- **光解操作要点：**对细菌进行 PMA 处理后，需进行光解，使染料与死细胞 DNA 共价结合，一般采用蓝光。光照强度越高，光解效率越好。不过，非 LED 灯（如卤素灯）照射时易使样本升温，影响分析结果，建议照射时用冰块给样品降温。
- **样本保存注意事项：**样本可在光解后冷冻保存。若在 PMA 处理和光解前冷冻，可能损坏细胞膜，导致假阴性结果。若需检测前冷冻样本，应先做预实验。
- **DNA 提取与对照设置：**PMA 通过沉淀去除共价修饰的 DNA。提取基因组 DNA 时，需用相同体积的洗脱液进行体积归一化。阳性对照建议选用活细胞的基因组 DNA。
- **有效性验证方法：**验证 PMA 在测试样本中的有效性，可对比相同处理样本添加与未添加 PMA 时的 $C_t(dC_t)$ 变化。
- **操作前准备：**使用前将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- **储存与使用要求：**试剂盒组分含荧光染料，使用和保存时需注意避光。
- **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：

- **储备液制备：**在组分 A (Propidium Monoazide Bromide, PMA) 中添加 98 μ L 超纯水，充分涡旋混匀，配制成 20 mM 的 PMA 储备液。

注：储备液配制完成后建议分装后，-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 $OD_{600} \approx 1.0$ 。

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 PMA；
- **活细菌对照组：**加入 PMA；
- **死细菌对照组：**加入 PMA；



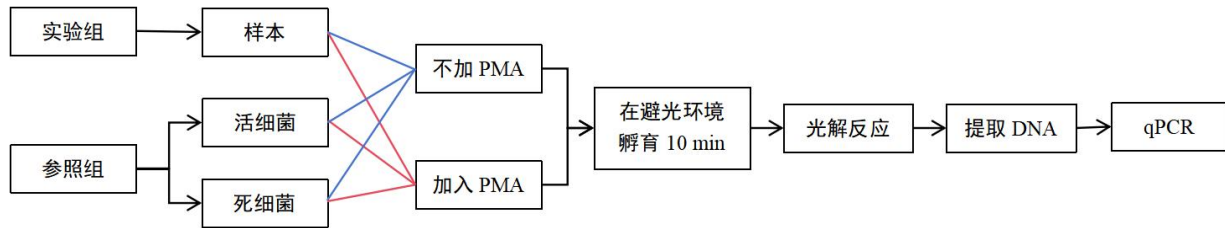
仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

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

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

二、操作步骤

1. 操作步骤流程图如下：



注：有文献报道可用于病毒检测；主要依靠完整的病毒衣壳阻碍PMA进入的机制进行检测。若检测土壤或粪便复杂样本的话，请先用无菌的PBS进行稀释，通过提高PMA的浓度（增加到 100-200 μM ），且需增加光照时长。

2. 细菌处理：

- (1) 取两份 400 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min，或 58 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 小时，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。

3. 染色

- (1) 两份活细菌，一份不做 PMA 处理，另一份 25 μM PMA 处理。

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

- (2) 将经 PMA 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 PMA 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。

4. 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：PMA 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）。

5. 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 $\times$
F, R 引物	适量	各 0.4 μM
模板	适量	—
H ₂ O	补足至 20 μL	—

6. 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 PMA 是否成功抑制了死细菌 DNA 的扩增，计算如下：

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

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



(3) 活细菌 dCt 预期值接近 0±1, 这意味着 PMA 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、PMA 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:

$$dCt_{\text{样本}} = Ct_{\text{样本, PMA 处理}} - Ct_{\text{样本, PMA 未处理}}$$

(2) dCt 值转换为活细菌比例:

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

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

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。

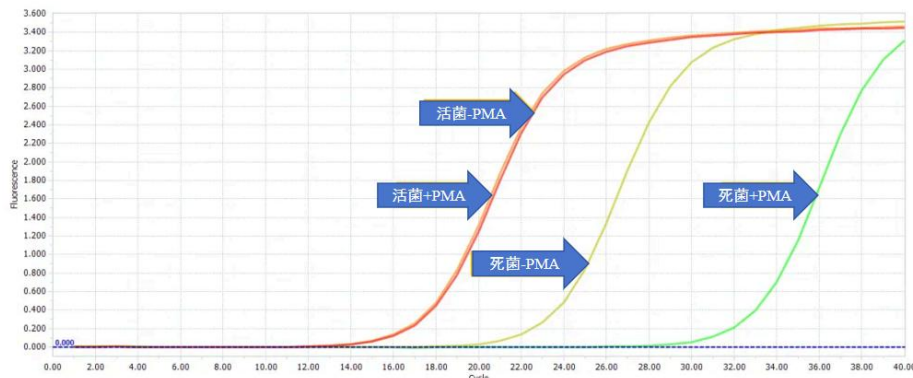
(2) 实验样本拷贝数的计算:

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

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

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 PMA 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: PMA 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 PMA 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光?

答: 在蓝光的照射下, 光解效率显著提升。PMA 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 PMA 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。

