

Ready-to-use PMA(20 mM in Water)

10 min 特异永久修饰死菌 DNA, qPCR 兼容, 即开即用, 无毒无漏检

产品货号: M10508

产品规格: 100 μ L

储运条件: 4 $^{\circ}$ 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。

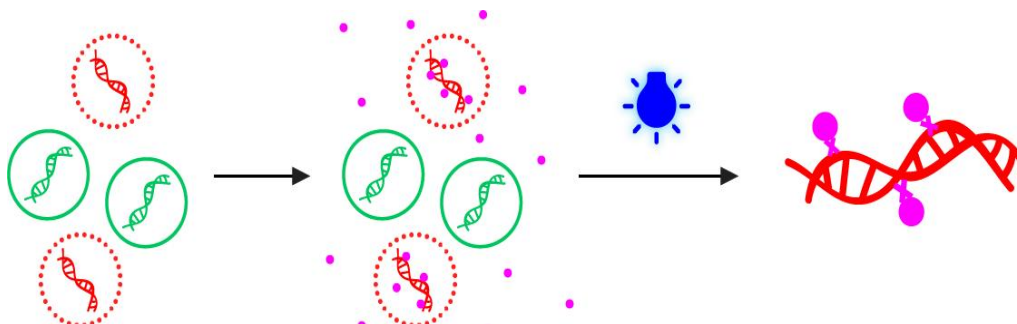


图 1.PMA结合死菌DNA示意图

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;
- **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: 橙红色液体;
- 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. Ready-to-use PMA(20 mM in Water)	100 μ L

注: 200 T 为试剂盒组分 A (Ready-to-use PMA)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Ct(dCt)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:

- 将试剂盒中的组分A (Ready-to-use PMA)在-20 $^{\circ}$ C取出, 平衡至室温(15-25 $^{\circ}$ C)。

注: 在首次使用时可进行分装, 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。

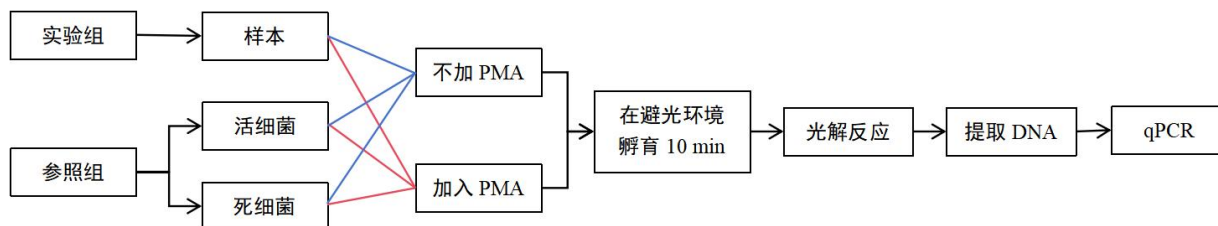
4. 对照设置

- 活细菌空白对照组: 不加 PMA;
- 活细菌对照组: 加入 PMA;
- 死细菌对照组: 加入 PMA;
- 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，具体依样本类型而定，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，另一份用 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。

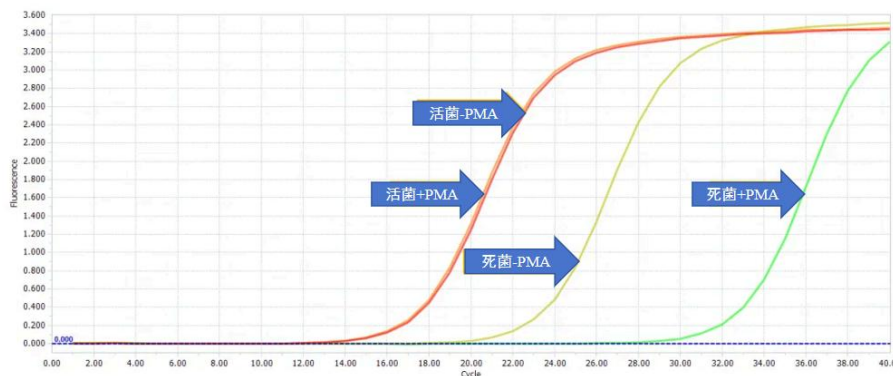
(2) 实验样本拷贝数的计算：

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

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

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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

