

## SYTO 9/PI 活细菌/死细菌双染试剂盒

### GenXion Bacterial Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTO 9, PI)

#### 产品信息:

品名	货号	规格	储运条件
SYTO 9/PI 活细菌/死细菌双染试剂盒	JX22	20T	-20℃避光保存， 冰袋运输
		100T	
说明	15 min 速染，精准定性定量检测细菌死活，操作简单灵活，适用范围广		

#### 产品简介:

GenXion Bacterial Live/Dead Cell Viability Assay Kits(SYTO 9, PI)是一款操作便捷的细菌活力检测专用试剂盒，以 SYTO 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 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 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 9 的绿色荧光产生淬灭效应，因此死菌中观察不到 SYTO 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 内对不同类群细菌实现快速、可靠的活菌死菌定量区分；同时试剂盒单独提供 SYTO 9 和 PI 溶液，支持染料配比的灵活微调，能为定量实验完成细菌荧光校准，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，通用型直接计数活力检测方法难以实现的科研背景，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。产品兼容荧光显微镜、荧光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等多种荧光检测仪器，可满足细菌悬浮液的荧光显微观察、荧光光谱分析、微孔板定量检测、流式细胞术分析等多场景研究需求，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性与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。

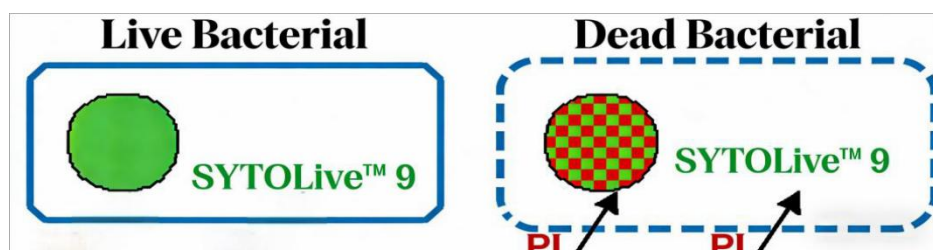


图1.染色工作原理图

#### 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 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；
- **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	20 T	100 T
A. SYTO 9	30 $\mu$ L	150 $\mu$ L
B. PI	30 $\mu$ L	150 $\mu$ 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 细菌悬液对应加入3  $\mu$ 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SYTO 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 SYTO 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. SYTO 9	1.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L
B. PI	1.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L
Dual-Stain Mixture	3 $\mu$ L	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L

##### 2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：激发/发射波长 Ex/Em：480/500 nm(SYTO 9)、Ex/Em：490/635 nm(PI)；
- 荧光酶标仪：激发/发射波长 Ex/Em：480/500 nm(SYTO 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(SYTO 9)、Ex/Em：490/635 nm(PI)。

##### 3. 对照组设置：

组别	SYTO 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	+	-	活死细菌悬液
单阳对照2	-	+	活死细菌悬液
实验组	+	+	实验组细菌

- 空白对照组：评估背景荧光干扰、检测细菌自身的自发荧光、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. 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)

### 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SYTO 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:

- (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( $OD_{670}$ )。
- (2) 使用0.85% NaCl 溶液将细菌悬液稀释 $OD_{670}$  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 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 细菌悬液, 加入 3  $\mu$ L 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 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: 各染料的孵育时长、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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

### 方案二: 荧光光度计检测

#### 1. 细菌重悬与计数:

- (1) 取菌液测定670 nm 的光密度( $OD_{670}$ )。使用0.85% NaCl 溶液将细菌悬液稀释 $OD_{670}$  到0.03~0.15 左右。

注: 稀释范围仅供参考, 具体可根据样本种类与实验条件灵活调整。

#### 2. 细菌重悬与计数:

- (1) 参照如下, 在1 cm 玻璃、丙烯酸或石英荧光比色皿中, 配制五种不同活/死菌比例的细菌悬液, 每个样本体积均为 3 mL。

活：死细菌比例	活细胞悬液(mL)	死细胞悬液(mL)
0：100	0	3.0
10：90	0.3	2.7
50：50	1.5	1.5
90：10	2.7	0.3
100：0	3.0	0

### 3. 细菌染色：

- (1) 在离心管内，将组分 A (SYTO 9)和组分 B (PI)按 1：1 的体积比混匀得到染料混合液。
- (2) 每组加入 9  $\mu$ L 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 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：各染料的孵育时长、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。

### 4. 荧光测定和数据分析：

- (1) 将染色后的菌液置于荧光光度计中，设置激发波长 470 nm，扫描并记录发射波长 490~700 nm 范围内的荧光发射光谱。
- (2) 分别测定发射光谱在 510~540nm (em1, 绿色) 和 620~650 nm (em2, 红色) 的累积荧光，计算二者的累计荧光比值 (RatioG/R)。公式如下， $\text{RatioG/R} = \text{F}_{\text{cell, em1}} / \text{F}_{\text{cell, em2}}$ 。
- (3) 制图，以大肠杆菌悬液内活细胞的占比为横坐标，以累积绿色荧光与红色荧光比 (RatioG/R) 为纵坐标。

### 方案三：荧光酶标仪检测

#### 1. 细菌重悬与计数：

- (1) 取菌液测定 670 nm 的光密度 (OD<sub>670</sub>)。使用 0.85% NaCl 溶液将细菌悬液稀释 OD<sub>670</sub> 到 0.03~0.15 左右。

注：稀释范围仅供参考，具体可根据样本种类与实验条件灵活调整。

#### 2. 细菌重悬与计数：

- (1) 参照如下，于 16×125 mm 高硼硅玻璃培养管中，配制五种不同活/死菌比例的悬液，每个样本总体积均为 2 mL。

活：死细菌比例	活细胞悬液(mL)	死细胞悬液(mL)
0：100	0	2.0
10：90	0.2	1.8
50：50	1.0	2.0
90：10	1.8	0.2
100：0	2.0	0

### 3. 细菌染色：

- (1) 在离心管内，将组分 A (SYTO 9)和组分 B (PI)按 1：1 的体积比混匀得到染料混合液。
- (2) 取 12  $\mu$ L 染料混合液，加入 2 mL 无菌的 ddH<sub>2</sub>O，混匀后制备 2×染色混合液。
- (3) 取 100  $\mu$ L 细菌悬液混合物加入 96 孔板，各样本设置三个平行孔。
- (4) 每孔加入 100  $\mu$ L 2×染色混合液，上下吹打使充分混匀。
- (5) 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 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：各染料的孵育时长、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。

注：96 孔板的边缘孔建议空置，以避免假阳性读数干扰实验结果。

#### 4. 荧光测定和数据分析：

- (1) 以485 nm 为激发波长，530 nm 为发射波长（em1，绿色）来测定每孔荧光
- (2) 以485 nm 为激发波长，630 nm 为发射波长（em2，红色）来测定每孔荧光；
- (3) 计算测定两种发射波长下的荧光强度，计算荧光比值(RatioG/R)。公式如下， $\text{RatioG/R} = F_{\text{cell, em1}} / F_{\text{cell, em2}}$ 。
- (4) 制图，以大肠杆菌悬液内活细胞的占比为横坐标，以RatioG/R 为纵坐标。

#### 方案四：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LB 培养基中。
- (2) 放于37 °C培养箱震荡培养生长至对数生长期。

##### 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SYTO 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：

- (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(OD<sub>670</sub>)。
- (2) 使用0.85% NaCl 溶液将细菌悬液稀释OD<sub>670</sub> 到0.03~0.15 左右。

##### 5. 细菌染色：

- (1) 在离心管内，将组分 A (SYTO 9)和组分 B (PI)按 1 : 1 的体积比混匀得到染料混合液，用 0.85% NaCl 溶液将染料 混合液稀释 10 倍。
- (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 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：各染料的孵育时长、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。

##### 7. 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）：

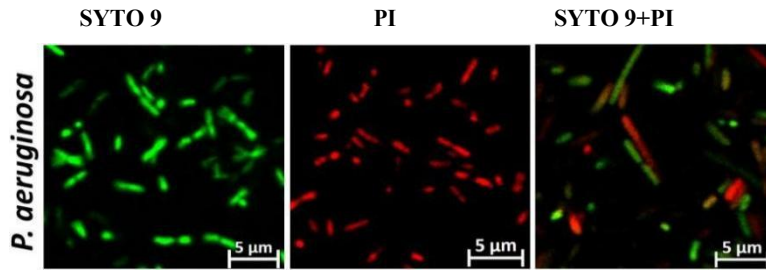


图 2.p.aeruginosa 染色效果荧光显微镜图

结果判读：在细菌生物膜实验中，SYTO 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。

2. 定量分析（流式细胞仪）：

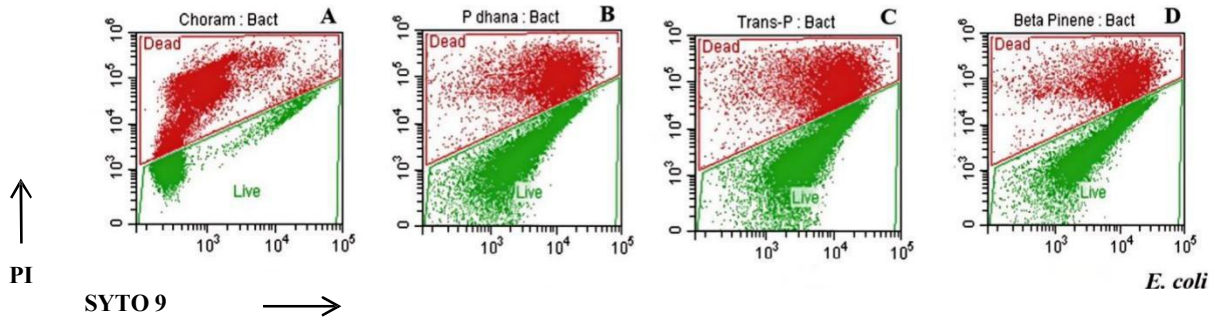


图3.E.coli 流式分析图

结果判读：通过流式细胞术，检测四种不同抗菌物质处理对大肠杆菌(E.coli)的杀菌效果，通过活菌（绿色）和死菌（红色）的分布来评估各处理的抗菌活性。

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，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 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 9 与PI 与核酸的结合。SYTO 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 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	JX21	JX22
染料形式	预混液A+B	液体单组分SYTO 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

官方网址：[www.genesion.com.cn](http://www.genesion.com.cn)

公司邮箱：[GenXion@vip.qq.com](mailto:GenXion@vip.qq.com)

订货热线：4006-169-114、020-84224925

