

倍視® BacSee®

# 全/死細菌螢光雙染色檢測套組 使用說明

## Total/Dead dual-staining kit for bacterial viability kit Product Information

### 快速使用指引

1. 存放條件：避光與低溫下(<-20 °C)。可存放逾一年。
2. 激發/放光波長(nm)：全細菌(470/520)、死細菌(530/640)。
3. 使用螢光顯微鏡與螢光 96 孔盤掃描儀時，建議工作溶液染色濃度：  
12 μM 的 **GA** / 20 μM 的 **RD** (稀釋 1000 倍)。

### 一、產品簡介

本細菌螢光雙染色檢測套組，提供兩種不同顏色之螢光探針，可同時對全部細菌(綠螢光)與死細菌(紅螢光)，分別進行染色，並利用螢光檢測儀器，例如：螢光顯微鏡(fluorescence microscopes)、螢光多孔盤掃描儀(fluorescence microplate reader)與流式細胞儀(flow cytometers)...等，進行檢測與定量。本套組可應用於大部分細菌，包括革蘭氏陽性菌，如：金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、口腔鏈球菌(*Streptococcus oralis*)；與革蘭氏陰性菌，如：大腸桿菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)...等。

### 二、使用前注意事項

1. 保存方式：請將本產品避光，並保存於低溫下(<-20 °C)。
2. 保存期限：正確保存下，可存放一年以上。
3. 解凍：本產品使用DMSO (dimethyl sulfoxide)作為溶劑，在低溫時，DMSO可能會發生結凍的情況，在使用前，請先將本產品置於室溫下完全解凍(約30分鐘)，稍加搖晃均勻後，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。
4. 反覆凍融：產品可反覆凍融。請將產品完全解凍，恢復至室溫後使用。使用完畢立刻鎖緊瓶蓋。產品一旦配置成操作溶液，不建議反覆凍融，請在兩小時內使用完畢。

### 三、套組內容(200 tests)：

1. BacSee 全細菌染劑保存液(**GA**)，棕色瓶身，綠標籤)：  
兩瓶，濃度 12 mM，每瓶 100 μL。
2. BacSee 死細菌染劑保存液(**RD**)，棕色瓶身，紅標籤)：  
兩瓶，濃度 20 mM，每瓶 100 μL。

### 四、產品使用步驟：

#### 1. 準備細菌樣品：

- 1.1 於 5 mL 適當的培養液中加入菌種，在培養箱裡培養隔夜。
- 1.2 在 10000g 下，離心 10 mins。

- 1.3 除去上清液，分別加入 2 mL 的 0.85% NaCl 水溶液，重新懸浮細菌。
- 1.4 取兩支 10 mL 離心管，分別標示“ **LIVE**” 與“ **DEAD**”。**LIVE** 管添加 5 mL 的 0.85% NaCl 水溶液。**DEAD** 管添加 5 mL 70%異丙醇水溶液。將步驟 1.3 的 2 mL 菌液，等分成 1 mL 兩份，分別加入 **LIVE** 與 **DEAD** 管中。將兩離心管在室溫下培養 1 小時，每隔 15 分鐘輕輕搖晃混合。
- 1.5 兩離心管在 10000g 下，離心 10 mins。除去上清液，分別加入 5 mL 的 0.85% NaCl 水溶液，重新懸浮細菌。
- 1.6 兩離心管在 10000g 下，離心 10 mins。除去上清液，分別加入 1 mL 的 0.85% NaCl 水溶液，重新懸浮細菌，得到 1mL 菌液。
- 1.7 視需要，可測量上述菌液的 OD<sub>670</sub>，以決定細菌濃度，並根據所使用的螢光儀器的建議檢測範圍，調整菌液濃度。

**注意事項：**一般來說，清洗細菌一次，就足夠去除培養液中會影響螢光染色的干擾物質，但我們仍建議如步驟 1.5 與 1.6，充分清洗細菌兩次。請勿使用磷酸鹽類水溶液，如 PBS，清洗細菌。磷酸鹽類水溶液會影響螢光染劑染色。

**注意事項：**視需要可先將產品中的兩個染劑以 0.85% NaCl 水溶液，先進行稀釋或混和，配製成工作溶液，再進行細菌染色；亦可直接使用產品所提供之染劑保存液。

## 2. 使用螢光顯微鏡(fluorescence microscopy)觀測：

### 2.1 濾鏡選擇：

染色後的全部/死細菌可同時觀察，亦可分別觀察。參考下表，使用推薦的濾鏡組：

	Omega 濾鏡組牌號	Chroma 濾鏡組牌號
同時觀測全部/死細菌	XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010
只觀測全部細菌	XF22, XF23	31001, 41001
只觀測死細菌	XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 41004

### 2.2 細菌染色：

a. 解凍：將所需染劑、溶液恢復至室溫，稍加搖晃均勻，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。

b. 將步驟 1.6 之 **LIVE** 管，加入 1 μL 的 **GA** 染劑；於 **DEAD** 管，加入 1 μL 的 **RD** 染劑。在室溫、避光下染色 15~60 mins。

### 2.3 用螢光顯微鏡計算細菌生存率：

a. 參考步驟 2.1 的濾鏡組建議，選擇適合的濾鏡組合。

b. 將全部細菌個數減去死細菌個數即為活細菌個數，再除以全部細菌個數，取百分率，即為細菌存活率。

$$\text{細菌存活率(\%)} = \frac{\text{綠螢光全部細菌數} - \text{紅螢光死細菌數}}{\text{綠螢光全部細菌數}} \times 100\%$$

### 3. 螢光 96 孔盤掃描儀(fluorescence microplate reader) :

#### 3.1 激發光源與螢光放光波長選擇：

**GA**全細菌染劑：

激發光源波長，470±10 nm；綠螢光放光波長，520±10 nm。

**RD**死細菌染劑：

激發光源波長，530 ± 10 nm；紅螢光放光波長，640 ± 20 nm。

#### 3.2 細菌染色：

- 解凍：將所需染劑、溶液恢復至室溫，稍加搖晃均勻，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。
- 調整細菌濃度：
 

調整步驟 1.6 之兩菌液(LIVE & DEAD)濃度，使細菌濃度不低於  $2 \times 10^7$  (OD<sub>670</sub>~0.30)。
- 將調整菌液濃度後的 LIVE 與 DEAD 菌液，以不同體積比例混合，作為不同細菌存活率之檢量線標準品。例如，LIVE/DEAD=1.0/0.0、0.8/0.2、0.5/0.5、0.2/0.8、0.0/1.0 分別代表細菌存活率為 100%、80%、50%、20%、0%。
- 於上述步驟之 1 mL 菌液，加入 1 μL 的 **GA**染劑與 1 μL 的 **RD**染劑。
- 除菌液外，需額外準備無菌空白試驗液，將一支裝有 1 mL 的 0.85% NaCl 無菌水溶液分別加入 1 μL 的 **GA**染劑與 1 μL 的 **RD**染劑，標示為 **BLANK**。
- 將上述的溶液在室溫避光下，染色 15~60 mins。

#### 3.3 掃描儀操作步驟：

- 將上述步驟之溶液，各吸取 200 μL，轉置到螢光專用孔盤的適合孔位中。孔盤最外圍的孔位(A 和 H 行、第 1 和第 12 列)，請避免使用。每個樣品間，建議相隔一孔位，避免相鄰孔位的螢光干擾。建議每個測試條件至少有三個重複實驗(三孔)。根據步驟 3.1，設定螢光掃描儀，測量螢光強度值。

#### 3.4 計算細菌生存率：

- 將 **GA**染劑之讀值減去其對應之空白試驗讀值，即為全部細菌之螢光強度(讀值 1)；將 **RD**染劑之讀值減去其對應之空白試驗讀值，即為死細菌之螢光強度(讀值 2)。將兩螢光強度數值相除，取得比值。

$$\text{比值(G/R)} = \frac{\text{讀值 1}}{\text{讀值 2}}$$

- 將比值(Y 軸)對已知細菌存活率(X 軸，步驟 3.2c)做檢量線。
- 將未知樣品螢光強度比值帶入此檢量線，求出細菌存活率。

### 4. 困難排除

- 染劑變質：全細菌染劑(**GA**，棕色瓶身，綠標籤)與死細菌染劑(**RD**，棕色瓶身，紅標籤)，在正常存放條件下，不會發生變質現象，僅發出微弱螢光。若發生變質，而產生強烈螢光，可能會影響背景值，造成靈敏度下降。可以將染色後的菌液以 10000g 離心 10 mins，去除上清液後，加入沒有染劑之 0.85% NaCl 水溶液，來嘗試降低背景值。如果仍無法有效降低背景值，請聯絡本公司技術人員。

4.2 根據細菌的種類與狀態，每次染劑的最佳稀釋比例可能不同。一般來說，以能得到可觀測訊號的同時，染劑的濃度越低(稀釋比例越高)越好。又因為儀器與人眼，對綠色螢光(GA)較紅色螢光(RD)敏感。因此，我們可依循下列步驟，來決定最佳染劑稀釋比例：

- a. 產品解凍：將產品完全恢復至室溫後，稍加搖晃均勻，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後再使用。設定螢光多孔盤掃描儀之激發光源波長與螢光放光波長。
- b. 決定最佳稀釋比例與最佳染色時間（一般為求操作方便，可在室溫下進行。但為求標準化，操作者以亦可在定溫，如 37 °C 下，進行操作。）：
  - (I) 先決定死細菌染色條件：請將 RD(紅標籤)以 0.85% NaCl 水溶液稀釋，在 100-5000 倍的範圍內，嘗試染色死細菌，以低濃度(最大稀釋比例)為原則，將死細菌以 RD 染色，使死細菌在螢光檢測設備的檢測範圍內，有明顯可識別的紅色螢光訊號。染色時間每隔 10-15 分鐘，測量一次螢光訊號。**一般來說，使用 20 μM RD (1000 倍稀釋倍率)，在 45 分鐘染色後，紅螢光訊號達到飽和。**接著，將 GA(綠標籤)以 0.85% NaCl 水溶液稀釋，在稀釋比例 100-5000 倍的範圍內，將全細菌染色，以最高濃度(最小稀釋比例)為原則，使全細菌在螢光檢測設備中，在與 RD 相同染色時間，**不會**出現明顯之綠色螢光訊號。
  - (II) 將全細菌染色：使用濃度**略高於**上述步驟**不會**出現綠色螢光訊號之最高濃度(最小稀釋比例)之 GA 稀釋液，染色最低細菌濃度之全細菌，使全細菌在螢光檢測設備中出現明顯螢光訊號。若沒有明顯螢光，可嘗試將 GA 濃度提高，或是，提高全細菌濃度。
  - (III)綜合上述(I)與(II)，控制 RD 與 GA 的染色時間相同，RD 出現明顯螢光訊號的濃度，與 GA 剛剛好出現螢光訊號的濃度，即是此細菌株的最佳染色條件。

4.3 其他問題，請聯絡本公司技術人員。

\*感謝國立清華大學選用本產品。

---

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: [polycreatives@outlook.com](mailto:polycreatives@outlook.com)

聯絡人 Contact: Peter Hsu

