Ready-to-use PMA(20 mM inWater)

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 μL

储运条件：4 ℃避光保存；冰袋运输。

产品简介：

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、真菌等多类微生物及粪便、土壤、食品等复杂样本检测。

传统活菌计数依赖培养，其周期长、复杂基质适应性差，且无法检出VBNC（活的非可培养状态）菌，易低估活菌数。而PMA可以检出培养法漏检的VBNC菌，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。

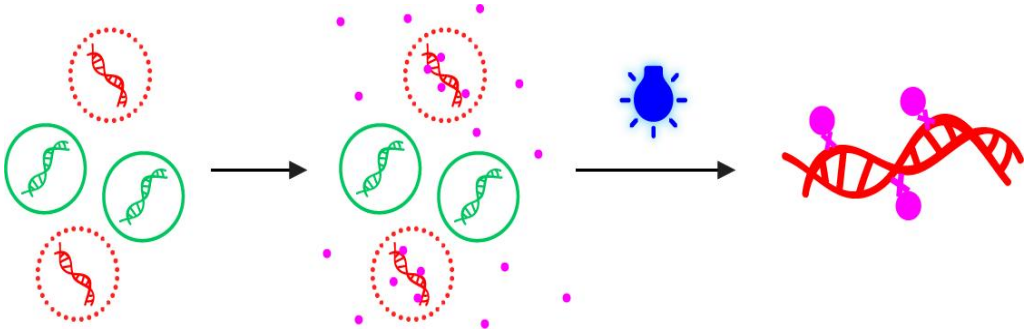


图 1. PMA结合死菌DNA示意图

注：别名Propidium Monoazide;

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

应用范围：细菌、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，不扰乱活菌代谢（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；
- **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、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：

- **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 µL

注：200 T 为试剂盒组分 A (Ready-to-use PMA)以 25 µM 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)从4 °C取出，平衡至室温(15~25 °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OD_{600}≈1.0。

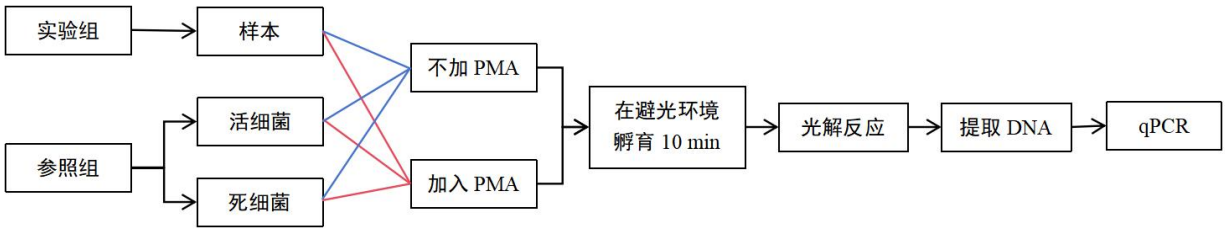
注：培养基种类和培养时长可依据实验情况调整。

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 ℃加热 5 min，或 58 ℃加热 3 h，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× 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×
F,R 引物	适量	各 0.4 μM
模板	适量	—
H_2O	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：

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

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

(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：

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

(2) dCt 值转换为活细菌比例：

$$PMA\ 抑制倍数=2^{（样本\ dCt）}$$

$$活细菌\%=100/PMA\ 抑制倍数$$

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。

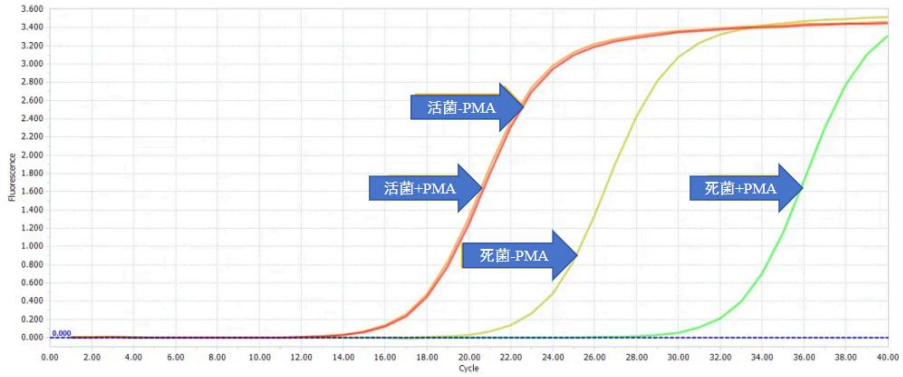
(2) 实验样本拷贝数的计算：

$$Ct=斜率*细胞数+y\ 轴截距(y=mx+b)$$

$$细菌数_{样本}=（Ct-y\ 轴截距）/斜率$$

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 ℃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灯？

  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。

- 问：EMA 和 PMA 应该如何选择？

  答：如何选用可参考下表：

产品货号	M10506	M10507	M10508
产品名称	EMA	PMA	Ready-to-use PMA
膜通透性	对部分活细胞细胞膜有微弱通透性	仅能穿透死细胞破损膜	
适用样本	仅适用于单纯菌液样品，复杂样本中干扰明显	真菌、细菌、病毒等，适配复杂样品	
PCR 抑制效果	与 DNA 结合稳定性较弱，PCR 抑制效果有限，高活菌比例样品中易出现死细胞信号残留	与 DNA 共价结合稳定，对死细胞 DNA 的 PCR 抑制作用强，死活区分度高	
安全性	细胞毒性略高，且 DMSO 溶剂可能对部分细胞活性产生影响	细胞毒性相对较低	细胞毒性相对较低，水溶剂更友好
应用场景	简单样品的基础死活菌检测	环境样本、临床样本、食品检测等复杂样品的高精准死活菌区分	高通量检测、需避免 DMSO 影响的活细胞实验、快速检测场景