

## PMA (20 mM in Water)

### 1 产品基本信息

产品名称（中文）：聚甲丙烯酸（20mM 水溶液）

产品名称（英文）：Ready-to-use PMA (20 mM in Water)

产品编号：MF1821

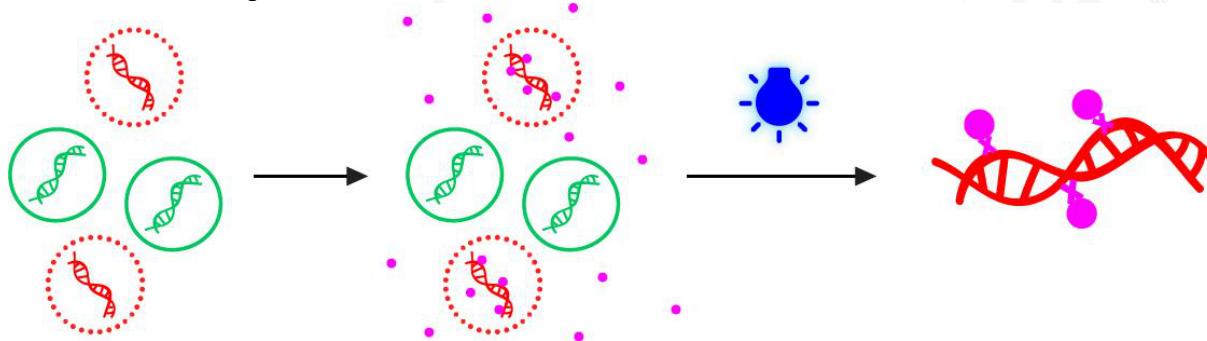
### 2 规格或纯度

100  $\mu$ L

### 3 产品介绍

产品简介：

PMA 是一种对双链 DNA 亲和性极高的染料，自身荧光微弱，与核酸结合后荧光显著增强。因无法穿透细胞膜，它能特异性修饰膜受损的死细胞 DNA。在约 464nm 蓝光照射下，PMA 修饰的 DNA 发生光解，其光反应性叠氮基转化为高活性氮烯自由基，与 DNA 结合位点附近烃基反应，形成稳定共价氮碳键，实现 DNA 永久修饰（图 1），这使 DNA 不溶，在提取基因组 DNA 时随细胞碎片丢失，阻碍死细胞目标 DNA 的 PCR 扩增。未结合的 PMA 在强光下与水反应，分解为无交联活性的羟胺，不影响 PCR 扩增。凭借此特性，PMA 结合实时定量 PCR (qPCR) 技术，可检测细菌、生物膜、酵母等多样本。与 qPCR、NGS 等技术联用，广泛应用于食品、水安全及环境检测领域。



产品特点：

- 特异性高：特异性与死菌 DNA 结合，且阻碍后续的死菌基因组 DNA (gDNA) 的提取与 qPCR 扩增；
- 高选择性：PMA 比 EMA 更有效地与死细胞 DNA 结合，提高活死细胞区分准确性；
- 应用广泛：检测多种样本类型包括细菌、生物膜、酵母、真菌、病毒和真核细胞等；
- qPCR 兼容：PMA 与 qPCR 技术更兼容，提供更可靠的活细胞数量测定；
- 光稳定性：PMA 在光照下更稳定，优于 EMA。

适用范围：

核酸染料死活细菌鉴定

### 4 储存与运输

储存条件：-20°C避光保存；试剂盒组分含荧光染料，使用和保存时需注意避光。

运输条件：冰袋运输

### 5 使用方法（仅供参考）

(1) 吸取 10 $\mu$ L 菌液至液体 LB 培养基，放入细菌培养箱培养过夜或更久，直至细菌达到对数生长期 ( $OD_{600} \approx 1.0$ )。需注意，培养基种类和培养时长可依据实验情况调整。

- (2) 取两份 400μL 活细菌，分别置于洁净的离心管中。
- (3) 若需死细菌作为对照（可选），可将活细菌放入水浴锅，选择 95°C 加热 5 分钟，或 58°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。
- (4) 两份活细菌，一份不做 PMA 处理，另一份用 25μM PMA 处理（处理不同类型或来源细菌的最佳 PMA 浓度，需查阅相关文献确定）。
- (5) 将经 PMA 处理的样本置于室温摇床上，避光孵育 10 分钟，让染料与样本充分混合。
- (6) 对样品进行蓝光照射，照射时长需自行摸索确定。例如可使用 60W 蓝光灯照射 15 分钟；若使用卤素灯，建议将 PMA 处理后的样本管放置在距离光源 20cm 处的冰块上（冰块置于透明托盘中），调整光源直射样品，光解 5-15min；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。
- (7) 将处理和未处理的活细菌以 5000×g 的转速离心 10 分钟，去除上清液。
- (8) 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。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）。

(9) 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 <sub>2</sub> O	up to 20 μL	-

- (10) 轻柔涡旋使反应混合液均匀混合，随后转移一定体积至 PCR 管。
- (11) 测试程序（根据自备 qPCR Mix 进行程序设定）。
- (12) 数据分析：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。在开展 PMA 活细菌检测前，建议先对引物及 PCR 程序的适用性进行验证。

(13) 计算死、活细菌对照 dCt：

- qPCR 实验结束后，用仪器自带软件计算每个样本的 Ct 值。
- 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：

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

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

- 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。
- 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%）。
- 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。

(14) 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。

- 样本 dCt 值的计算：

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

- dCt 值转换为活细菌比例:

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

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

(15)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。

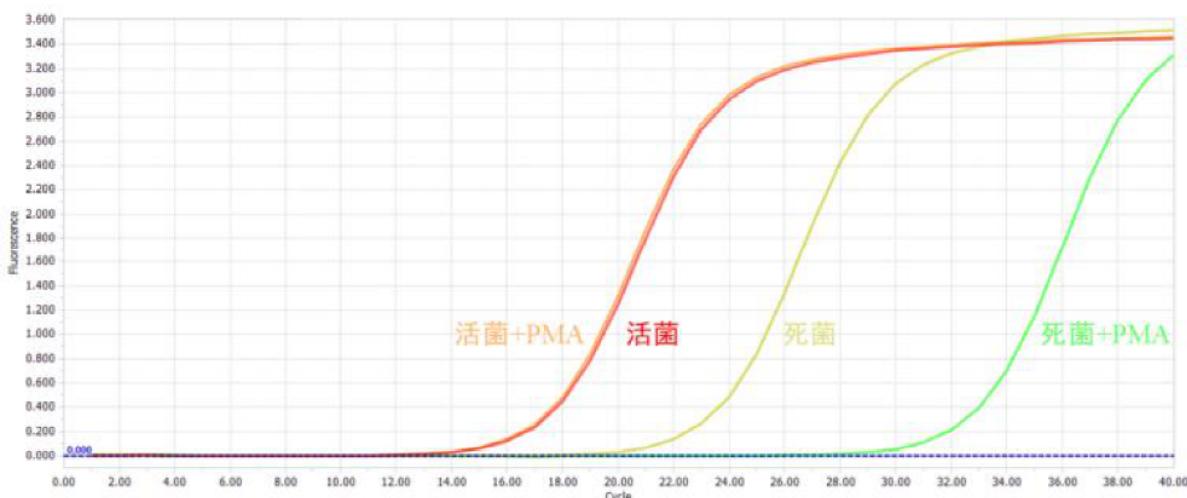
- 制作标准曲线, 细胞数为横坐标, Ct 值为纵坐标。
- 实验样本拷贝数的计算:

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

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

注: 纯化过程中活细菌 DNA 未损失。

示例: 活 / 死大肠杆菌用  $25\mu\text{M}$  PMA 孵育后光解处理, 然后提取 gDNA, 采用 uidA 引物进行扩增 (具体结果参考对应实验图谱)。



## 6 常见问题

**Q1: 死菌与活菌 dCt 小于 1, 可能是什么情况导致?**

答:

(1) 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。

(2) 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。

**Q2: 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。

**Q3: 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 纳米) 的精准激活下, 蜕变为一群高活性的氮烯自由基。这些自由基会搜寻并锁定 DNA 结合位点周边的烃基部分, 与之反应进而形成坚固稳定的共价氮碳键。这一过程是 PMA 与 DNA 实现深度交联的

核心环节，保障了对死细胞 DNA 的特异性修饰效果。

## 7 注意事项

- 1.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。
- 2.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。
- 3.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。
- 4.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。
- 5.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。
- 6.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。
- 7.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。
- 8.本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 9.为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。