

## 聚甲丙烯酸 PMA

### 1 产品基本信息

产品名称（中文）：聚甲丙烯酸（固体形式）

产品名称（英文）：PMA（Solid Form）

产品编号：MF1822

### 2 规格或纯度

1 mg

### 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

产品参数：

Ex（pH 3，光解前）：464 nm

Ex/Em（与核酸光交联后）：510/610 nm

分子式：C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>

分子量：511.5

### 4 储存与运输

储存条件：4℃避光保存

运输条件：冰袋运输

### 5 使用方法（仅供参考）

(1) 在离心管中添加 98μL 超纯水，加入 1mg PMA 固体，充分涡旋混匀，配制成 20mM 的 PMA 储备液，备用。

(2) 吸取 10μL 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<sub>600</sub>≈1.0）。需注意，培养基种类和培养时长可依据实验情况调整。

- (3) 取两份 400 $\mu$ L 活细菌，分别置于洁净的离心管中。
- (4) 若需死细菌作为对照（可选），可将活细菌放入水浴锅，选择 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟，或 58 $^{\circ}$ 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。
- (5) 两份活细菌中，一份不做 PMA 处理（空白对照），另一份加入适量 20mM PMA 储备液，使体系中 PMA 终浓度为 25 $\mu$ M（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）。
- (6) 将经 PMA 处理的样本置于室温摇床上，避光孵育 10 分钟，确保染料与样本充分混合并结合死细胞 DNA。
- (7) 对样品进行蓝光照射，照射时长需自行摸索确定：
  - 示例：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。
- (8) 将处理和未处理的活细菌以 5000 $\times$ g 的转速离心 10 分钟，去除上清液，保留菌体沉淀。
- (9) 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）。
- (10) 按如下体系制备反应混合液：

反应组分	20 $\mu$ L 反应体积	终浓度
（自备）qPCR Mix	-	1 $\times$
F、R 引物	适量	各 0.4 $\mu$ M
模板	适量	-
H <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu$ L	-

- (11) 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。
- (12) 测试程序（根据自备 qPCR Mix 进行程序设定）。
- (13) 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。

#### (14) 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：  
(缺公式)
- 活细菌 dCt 预期值接近 0 $\pm$ 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。

#### (15) 计算活细菌占比:

- 当死、活细菌对照结果无异常，计算样本 dCt 值:

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

- 将 dCt 值转换为活细菌比例:

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

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

## (16) 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。

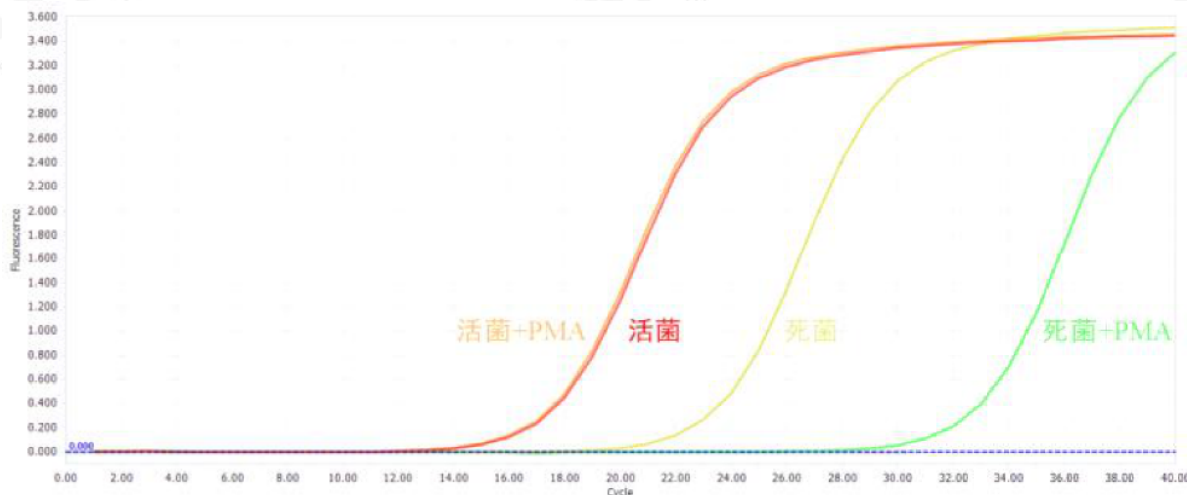
- 制作标准曲线, 以细胞数为横坐标, Ct 值为纵坐标。
- 实验样本拷贝数的计算: (缺公式)

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

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

注: 假设纯化过程中活细菌 DNA 未损失。

示例: 活 / 死大肠杆菌用 25μM 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°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 结合位点周围的烃基部分，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

- **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。