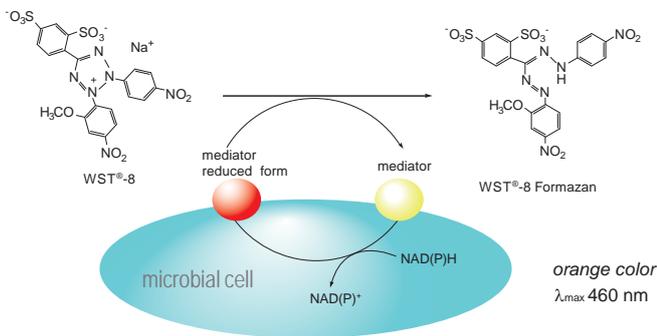


概述

微生物活性检测试剂盒是同仁化学研究所 (DOJINDO) 研发的通过比色法检测微生物代谢活性的新型试剂盒。脱氢酶是生命体能量代谢中非常重要的辅酶, 与生命体活动有着非常密切的关系。Microbial Viability Assay Kit-WST® 中含有WST®-8, 它在电子载体的作用下被微生物体内的脱氢酶还原, 生成高水溶性甲臃。生成甲臃的量与微生物的数量成正比。因此利用这一正比关系可以直接检测微生物的数量 (本试剂盒内包含实验所需的试剂, 使用更加简便快捷)。

检测机制



试剂盒内含

- WST® Solution 1 ml × 5瓶
- Electron Mediator Reagent (DMSO Solution) 0.5 ml × 1瓶

所需的设备和材料

- 带有450-490 nm滤光片的酶标仪
- 96孔培养板
- 10 μl、200 μl可调式移液器及多通道移液器
- 37 恒温培养箱
- 1.5 ml EP管

检测步骤

1. Working Solution的配制 : 将WST® Solution与Electron Mediator Reagent以9:1的体积比, 在1.5 ml EP管中混合。(Working Solution在4 条件下可稳定保存1个月)
 - * 在检测革兰氏阳性菌和真菌时, 先用无水DMSO或灭菌水将Electron Mediator Reagent稀释8倍后, 然后按上述比例配制Working Solution。
 - * 在检测革兰氏阴性菌时, 直接将WST® Solution与Electron Mediator Reagent以9:1的体积比配制Working Solution即可。但也有一些革兰氏阴性菌 (如 *Vibrio Parahaemolyticus*) 效果不好, 请按照检测革兰氏阳性菌和真菌的方法配制Working Solution。
 - * 96孔板中每孔加入10 μl Working Solution。

2. 存活率检测 :

- a) 96孔板中每孔加入190 μl细菌悬液。
 - b) 每孔中添加10 μl Working Solution。
 - c) 在37 培养箱中培养。
 - d) 用酶标仪检测在450 nm处的吸光度。
- * Blank为不含微生物的培养基。

注意事项

1. 还原性物质会将WST®还原, 对检测造成影响, 实验前请先确认药物是否与WST®发生反应。
2. 实验操作时尽量避免气泡的生成。
3. 关于加入Working Solution后的培养时间, 与微生物的种类或代谢活性有关。
4. 部分微生物在发生反应后, 有褪色的可能性。

实验例

药物敏感性实验 : 革兰氏阴性菌

1. 将微生物在适当的培养基中培养。
2. 先用灭菌生理盐水稀释细菌悬液, 使其在550 nm的吸光度为0.125倍 (相当于0.5 McFarland马克法兰氏浊度标准), 然后用灭菌生理盐水稀释上述细菌悬液10倍 (大约10⁷ CFU/ml)。
3. 制备Working Solution。
4. 用含有合适的Ca或Mg离子浓度的MH肉汤 (Mueller-Hinton Broth) 将抗生素 (药物) 按1/2的比例稀释成一个系列浓度 (例如 : 64 μg/ml, 32 μg/ml, 16 μg/ml, 8 μg/ml, 4 μg/ml, 2 μg/ml, 1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 0.25 μg/ml, 0.12 μg/ml, 0.06 μg/ml)。
5. 分别取180 μl含有抗生素的MH肉汤加入到96孔板每孔中。
6. 每孔加入10 μl细菌悬液。
7. 在微生物最适宜的温度条件下培养6 h。
8. 加入10 μl Working Solution后继续培养2 h。
9. 用酶标仪检测在450 nm处的吸光度。

本试剂盒确定可以检测的微生物如下

真 菌	<i>Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae,</i>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii, Candida albicans,</i>
	<i>Candida krusei, Candida parapsilosis.</i>
革 兰 氏 阳 性 菌	<i>Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, Enterococcus faecalis, Lactobacillus casei, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Acetobacter sp., Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.</i>