



Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity Kit for Fungi/Yeast

——细胞活性和细胞毒性检测试剂盒

产品货号	包装规格
A019	1000次（荧光显微镜分析）

储存条件：-20℃，避光保存。

产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

ABP Biosciences Inc

武汉市东湖新技术开发区高新大道666号

光谷生物城生物创新园C2-4栋5楼

电话：400-0667-718

邮箱：sales@abpbio.cn

网址：www.abpbio.com (英文)

www.abpbio.com.cn (中文)

© 2020 ABP Biosciences, Inc.

Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity Kit for Fungi/Yeast

产品货号: A019

组份	试剂名称	包装	储存条件	有效期
组份A	Yeast stain	300µl, 10mM	-20 °C	1年
组份B	Calcofluor White M2R	500µl, 5mM	-20 °C	

产品介绍

适用于真菌/酵母的Cell-Check™ 细胞活性和细胞毒性检测试剂盒提供了一种极为简单灵敏的分析方法,可用于区分复杂的混合物或不纯的培养物中的活酵母和真菌。本试剂盒采用两种不同颜色的荧光探针(Yeast stain和Calcofluor White M2R)检测酵母细胞的活性。在具有完整浆膜和代谢功能的酵母中, Yeast stain可由黄绿色的胞内荧光转变为橘红色的空泡内荧光,而无论代谢状态如何, Calcofluor White M2R都会与细胞壁结合,产生蓝色荧光。可用于荧光仪, 荧光显微镜或微孔板检测, 及其他的荧光检测系统。本试剂盒的检测原理简单, 应用于大多数的真菌/酵母细胞。本试剂盒操作简单, 快速, 安全, 检测灵敏度高等优点。

注意事项

1. 使用1~50 µM的Yeast stain染色液对新陈代谢活性的酵母细胞进行染色, 在一个小时之内即可完成酵母细胞空泡内橘红色荧光染色, 形成的空泡结构直径大概为0.5~0.7µm。
2. 本实验步骤操作指南给科研工作者在研究真菌活性实验方面提供了一个实验案例。以下操作指南适用于各种不同的悬浮液体, 比如血液、唾液等, 但是值得注意, 核苷酸和某些培养基组份可能会与Calcofluor White M2R染料结合, Yeast stain 染色液可能也会以某种未知的方式结合到这些组份中, 从而引起真菌细胞染色中出现背景荧光信号。
3. 在进行真菌染色之前, 小心移除真菌生长培养基, 我们不推荐使用磷酸盐缓冲液, 因为这种缓冲液可能会影响到真菌细胞的染色效果。

选择合适的滤光片

Yeast stain染色液对真菌细胞活性的检测, 通常选用一些标准的滤光片即可, 一般使用长波通滤光片, 激发波长为480nm, 发射波长大于530 nm。当进行真菌细胞染色定量比率分析, 通常使用带通滤波器进行观察。使用Calcofluor White M2R对真菌细胞进行染色, 可以使用DAPI适用的滤光片进行观察。

实验步骤

一、制备酵母细胞悬液

1.1 收集生长对数期的酵母菌细胞悬液（浓度约为 $10^7\sim 10^8$ cells/ml），酵母菌细胞悬浮于酵母浸出粉胨葡萄糖（YPD）培养基。

1.2 取50 μ l酵母菌细胞悬液加到1ml 无菌的包含2% D -(+)葡萄糖和10 mM Na-HEPES (pH 7.2)的水溶液中。

1.3 $10,000 \times g$ 离心15分钟，弃上清，留菌体沉淀。

1.4 使用1ml 无菌的包含2% D -(+)葡萄糖和10 mM Na-HEPES (pH 7.2)的水溶液重悬菌体沉淀。

二、荧光显微镜分析

2.1 将上述制得的酵母菌细胞悬液浓度调整至 $10^6\sim 10^7$ cells/ml，分别加入Yeast stain染色液（终浓度为5~20 μ M）和Calcofluor White M2R（终浓度为25 μ M）。为了获得最佳染色效果，建议对酵母菌细胞浓度及染色液浓度进行优化测试。

2.2 将酵母菌细胞悬液与染色液混合均匀，30 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟。

2.3 吸取5 μ l酵母菌细胞染色混合液到一张干净的载玻片上，使用18 mm \times 18 mm 的盖玻片均匀覆盖染色混合液。

2.4 选取合适的滤光片在荧光显微镜下进行观察。

三、微孔板分析

3.1 使用装有 30~50 ml YPD培养基的 125 ml玻璃培养瓶，在 30 $^{\circ}$ C，200rpm条件下对酵母菌细胞进行过夜培养。

3.2 根据酵母菌细胞浓度确定染色液浓度。

3.3 收集5 ml酵母菌细胞悬液（浓度约为 2×10^7 cells/ml）， $10,000 \times g$ 离心15分钟，弃上清，留菌体沉淀。使用10 ml 无菌的GH溶液重悬菌体沉淀，菌体悬液的终浓度为 1×10^7 cells/ml。

3.4 取 200 μ l 蒸馏水，分别加入 96 孔微孔板的A行和H行，列 1~12 每个反应孔中。

3.5 分别取 100 μ l 酵母菌细胞悬液，加入 96 孔微孔板的行B~E，列 2~11 的每个反应孔中。

3.6 分别取 100 μ l GH溶液，加入 96 孔微孔板的行F~G，列 2~11 的每个反应孔中。

3.7 使用另外一个 96 孔深孔板，按照如下操作指南制备酵母细胞染色液和抑制剂溶液。分别取 150 μ l 4 \times 抑制剂溶液加到 96 孔板的行B~G，列 2 的每个反应孔中，然后，分别取 75 μ l GH溶液加到 96 孔板的行B~G，列 3~11 的每个反应孔中，最后，从 96 孔板的列 2 开始，取 75 μ l 4 \times 抑制剂溶液到列 3 反应孔中，进行 2 倍比稀释，稀释到列 10 弃掉 75 μ l溶液。然后，在 96 孔的行B~G，列 2~11 的每个反应中分别加入 75 μ l 溶于Na-HEPES缓冲水溶液的 4 \times 酵母菌细胞染色液。

- 3.8 将以上制备的两个 96 孔微孔板贴上密封膜，置于 15℃条件下放置 30 分钟。
- 3.9 使用8-道移液器分别取100μl 深孔板行B~G中的溶液，加到第一块96孔微孔板的行B~G的每个反应孔中，使用移液器上下吹打数次，混合均匀。
- 3.10 选用两组滤光片组合（激发/发射波长：~485/530 nm，绿色荧光；激发/发射波长：~485/620 nm，红色荧光）在合适的荧光酶标板上进行读数。
- 3.11 将96孔微孔板置于30 °C，300 rpm的条件下继续孵育，每隔10分钟进行一次读数，持续进行6次读数。
- 3.12 将每组对应的绿色和红色荧光值减去同一时间点荧光背景值（行F和G的平均值），并计算每个孔的红色/绿色荧光比率。
- 3.13 根据抑制剂浓度与红/绿荧光比的变化率的降低之间的剂量 - 反应关系，分析抑制剂效果。