

使用 LUNA-FL™ 荧光细胞计数仪 快速进行酵母细胞计数与活力测定

引言

酵母是生物学研究和工业中一种宝贵的生物体。它是最简单的单细胞真核生物。其基因组小、基因数量少以及单细胞特性，使酵母成为细胞生物学和遗传学（尤其是细胞周期调控和信号转导）中最重要的模型系统之一。酵母将碳水化合物转化为两种产物：二氧化碳和酒精。前者数千年来被用于烘焙，后者则用于酿造包括啤酒和葡萄酒在内的酒精饮料。近年来，酵母的酒精生产能力被应用于利用玉米和甘蔗生产生物乙醇。

目前计数酵母的方法是 ASBC（美国酿造化学家协会）方法。在该方案中，酵母细胞用亚甲基蓝染色，这是一种细胞膜不通透的染料。由于膜完整性受损，死酵母被染成蓝色，而活酵母则不会。由于酵母细胞尺寸小，需要在高倍率（例如，40 倍或更高物镜）下观察。放大倍数与视野（FOV）成反比。研究人员必须在血细胞计数板的小方格中计数活酵母和死酵母，移动显微镜载物台以覆盖相邻方格，并在下一个方格中计数活酵母和死酵母。计数持续进行，直到达到总计 0.1 微升的计数体积。对于血细胞计数板中央的大方格，这对应于 25 个小方格。这个过程既繁琐又痛苦（可能长达 30 分钟！）。由于人为误差、人为判读和计数体积小（0.1 微升），ASBC 方法的统计学显著性较低（典型误差为 25%）。此外，在复杂的培养物（啤酒和葡萄酒酿造以及生物乙醇生产）中，手动计数更加困难。研究人员需要逐个颗粒区分酵母细胞和非细胞碎片（啤酒酿造中的啤酒花、葡萄酒酿造中的葡萄以及生物乙醇生产中的玉米醪）。相比之下，LUNA-FL™ 荧光细胞计数器计数 0.5 微升计数体积中的酵母细胞仅需约 30 秒，这是 ASBC 方法的五倍。

由于不涉及人为误差和人为判读，且计数体积更大，可以获得更高的统计学显著性。用户无需区分酵母细胞和非细胞碎片（啤酒花、葡萄和玉米醪）。此外，如果使用两种染料且它们的荧光激发/发射波长与 LUNA-FL™ 荧光细胞计数器的光学系统兼容，则可以根据不同标准测量细胞活力。

荧光素二乙酸酯（FDA）是一种荧光细胞活力探针。由于其膜通透性，FDA 可以自由进出从细菌到哺乳动物细胞等多种生物体的质膜。内化的 FDA 被细胞内酯酶切割并转化为荧光素。荧光素的激发峰在 494 纳米，发射峰在 521 纳米，因此它适用于传统显微镜和 LUNA-FL™ 自动荧光细胞计数器的绿色通道滤光片组。转化后的荧光素由于位于 3 号碳的羧酸而带有一个负电荷，因此无法再穿过质膜。其保留能力需要完整的质膜。因此，FDA 染色测量酯酶的代谢活性质膜完整性。总体工作原理总结在图 1 中。

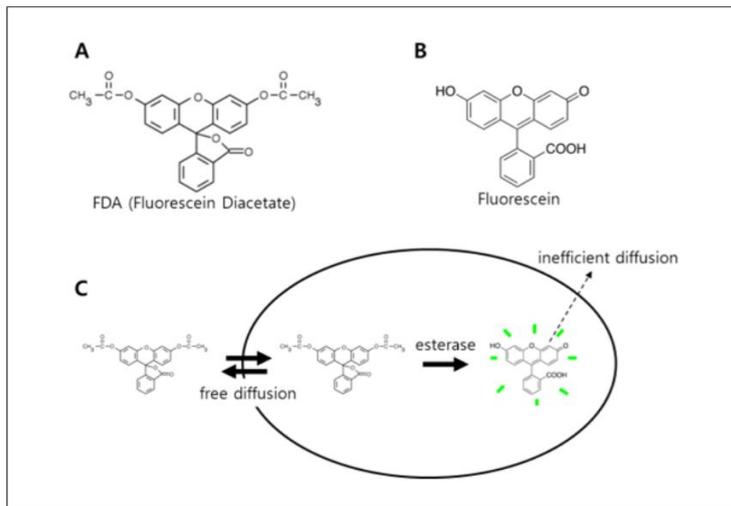


图 1. 使用 FDA 进行酵母计数的工作原理。

材料

酿酒酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae*)
 酵母培养基 (YPD)
 LUNA-FL™ 荧光细胞计数仪
 适配 LUNA FL™ 的 PhotonSlide™ 计数板
 酵母活力试剂盒
 FDA 和 PI 染色溶液
 酵母稀释缓冲液
 荧光信号增强剂 1

方法

1. 在 YPD 培养基中过夜培养酿酒酵母。
2. 将收集的酵母以 1:100 稀释，并再培养 3 小时以获得对数中期细胞（可选步骤）。
3. 根据酵母细胞的浓度，用酵母稀释缓冲液将酵母培养物稀释 1:100（过夜培养）。离心，弃去上清液，用酵母稀释缓冲液重悬沉淀（对数中期酵母）。（可选步骤）
4. 将酵母样品在 70°C 加热 30 分钟以制备 0% 活力的酵母细胞。（可选步骤）
5. 混合 1 μl 荧光信号增强剂 1 和 17 μl 酵母样品。（可选步骤）
6. 在室温下孵育 10 分钟。（可选）
7. 向酵母样品中加入 1 微升 FDA 和 1 微升 PI。
8. 在室温下孵育 10 分钟。
9. 将 10 微升染色后的酵母样品加样到计数载玻片上。

10. 等待约 1 分钟或直到所有酵母细胞静止不动。
11. 打开 LUNA-FL™，点击“Yeast Cell Counting (FDA/PI)”。
12. 使用以下 protocol 进行细胞计数。

Protocol 内容	数值
Exposure level (green/red)	18/18
Dilution factor	1.11 如果您的原始样品用酵母稀释缓冲液稀释过，请务必考虑额外的稀释因子
Cell Size	1-20µm
Green Fluorescence Threshold	2-3
Red Fluorescence Threshold	2-3

结果与讨论

如图 2A 所示，当测试 100%活力的酵母样品时，FDA 可以成功染色所有酵母细胞。

在明场图像中可见的所有酵母细胞均被计数，并用绿色圆圈标记（绿/红圆圈分别代表由 LUNA-FL™自动分类的活/死细胞）。为了观察 FDA/PI 染色是否能区分活酵母和死酵母细胞，我们特意通过在 70°C 加热 30 分钟来杀死酵母细胞（0%活力样品）。通过以 1:1 的比例混合 100%和 0%活力样品制备了 50%活力样品。如图 2B 和 2C 所示，即使活酵母和死酵母混合在同一个样品瓶中，FDA/PI 染色也能成功区分它们。与 100%活力样品一样，所有酵母细胞均根据其健康状况被计数并用绿色或红色圆圈标记。接下来，我们使用 0%、25%、50%、75%和 100%活力样品测量了 LUNA-FL™活力测定的精密度。如图 2D 所示，用 LUNA-FL™测量的实际活力与理论活力显著相关，相关系数 R^2 为 0.9991。综上所述，FDA/PI 染色结合 LUNA-FL™荧光计数器可以精确地计数酵母细胞并进行活/死判断。

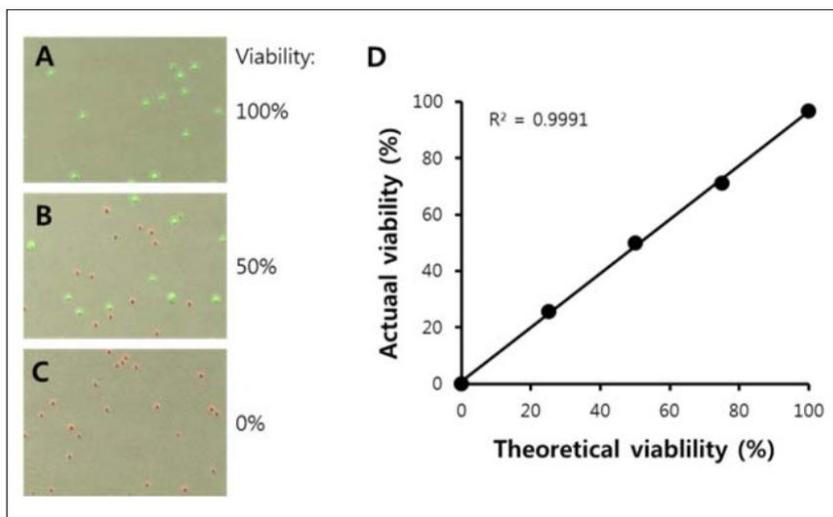


图 2. 使用 LUNA-FL™进行自动酵母细胞计数

与 AO/PI 染色（两种核酸结合染料瞬间结合基因组 DNA）不同，FDA 染色利用酶促反应产生荧光。因此，荧光强度达到可检测水平需要一些时间。为了测量检测荧光素所需的最佳时间，将 FDA 添加到 100%活酵母细胞中，并在添加染料后的 0、5、10、15、20 和 30 分钟测量对象（酵母细胞）的平均荧光强度。如图 3A 所示，在没有孵育时间的情况下，FDA 荧光与背景（约 40）无法区分。在前五分钟内，酵母细胞迅速获得荧光信号。荧光素积累的速率在接下来的五分钟内显著下降，并在反应后 10 分钟达到平台期。我们决定将酵母细胞和 FDA 孵育 10 分钟以获得最佳的酵母计数。

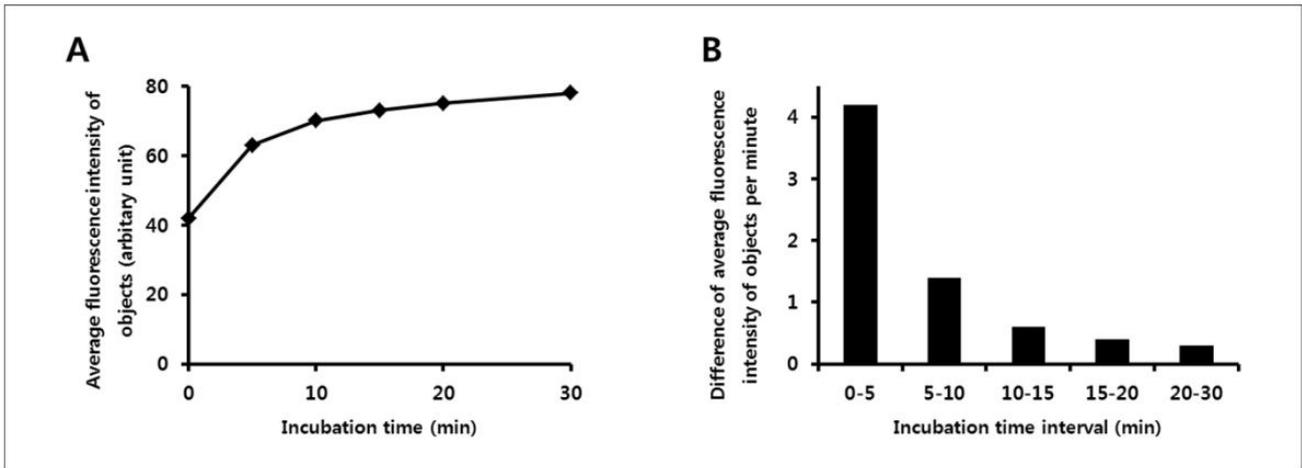


图 3. FDA 对酵母染色的动力学

如前所述，虽然 FDA 本身不发光，但一些细胞培养基具有自发荧光（图 4A）。这种背景荧光掩盖了一些酵母细胞的微弱信号。此外，新鲜的 YPD 培养基含有残余的酯酶活性（图 4A/4B）。如果 FDA 被细胞外酯酶活性切割成荧光素，荧光素分子就无法再进入酵母细胞，从而导致背景荧光变强，同时对对象荧光变暗。由酯酶活性贡献的背景荧光程度远大于 YPD 的自发荧光。自发荧光和残余酯酶活性似乎源于 YPD 培养基的成分，很可能是酵母提取物和蛋白胨。有趣的是，与新鲜 YPD 培养基相比，用于过夜培养酵母细胞的 YPD 培养基含有较低水平的酯酶活性。显然，YPD 培养基中含有酯酶活性的蛋白质成分被酵母细胞吸收，并在其增殖时用作酵母细胞的构建模块。总之，一些培养基含有自发荧光和残留酯酶活性。在这种情况下，应将培养基在适当的缓冲液（例如，酵母稀释缓冲液）中稀释（图 4C）。或者，如果背景荧光仍然太亮，应将整个酵母培养物离心，去除所得上清液，并将其沉淀重悬于酵母稀释缓冲液中。



图 4. YPD 培养基具有自发荧光并含有酯酶活性。

根据酵母菌株和培养条件的不同，即使被酯酶激活的荧光素也可能泄漏。如图 5A 所示，泄漏导致背景更高，酵母细胞的荧光强度更低。来自 Logos biosystems 的专有试剂（荧光信号增强剂 1）可以帮助防止激活的荧光素从酵母细胞中泄漏出来。如图 5B 所示，由于荧光信号增强剂 1 阻断了荧光素的输出，背景变得更暗，单个酵母细胞变得更亮。

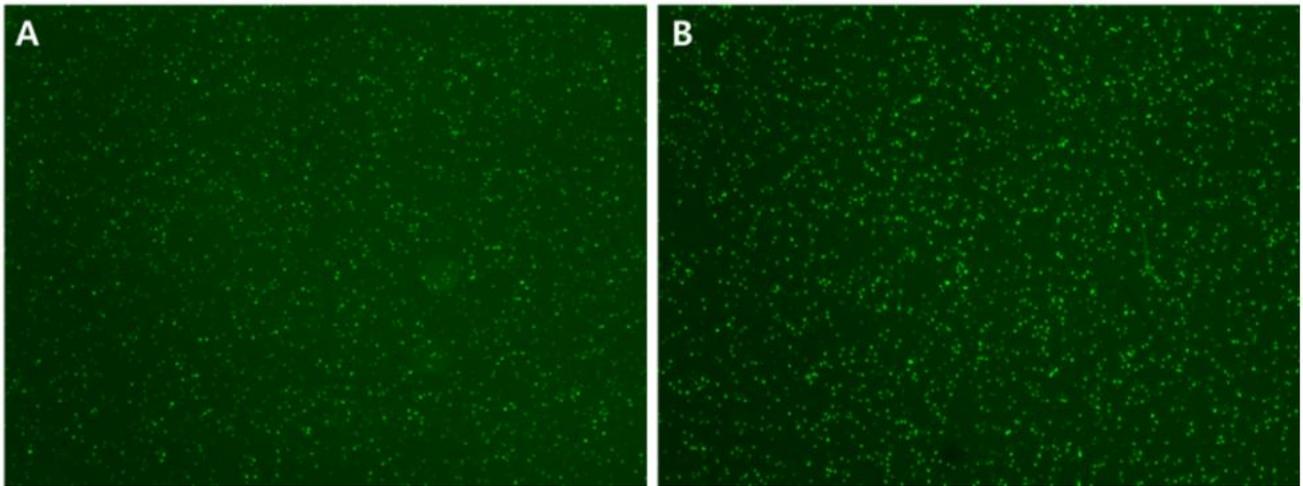


图 5. 荧光信号增强剂 1 降低了背景荧光水平并增加了酵母细胞的荧光强度。

结论

当与 FDA/PI、酵母稀释缓冲液和荧光信号增强剂 1 结合使用时，LUNA-FL™可以在 30 秒内以卓越的准确度和精密度计算酵母总数并测量其活力。由于 LUNA-FL™可以计数复杂培养物以及纯培养物中的酵母细胞，因此广泛的学术界、生物技术公司/大型制药企业和酿酒行业都可以成为受益者。

• LUNA-FL™ 技术参数

性能	样品体积	10 μ l
	细胞计数时间	30 sec
	细胞浓度范围	$5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml
硬件	激发波长	470 +/- 20 nm
	发射波长	530 +/- 25 nm (绿色) 600 nm LP (红色)
	光源	LED
	图像分辨率	5 MP
	液晶显示屏	7 英寸
	电脑	自带
	机器尺寸 (宽 x 深 x 高)	22 x 21 x 9 厘米 (8.6 x 8.3 x 3.5 英寸)

• 订购信息

货号	内容描述	规格
L20001	LUNA-FL™ 荧光细胞计数仪	1 台
L12005	PhotonSlide™, 50 片 (100 次计数)	1 盒
L12006	PhotonSlide™, 500 片 (1000 次计数)	10 盒
L12007	PhotonSlide™, 1000 片 (2000 次计数)	20 盒
F23202	酵母活力试剂盒 - FDA 染色溶液 - PI 染色溶液 - 酵母稀释缓冲液 - 荧光信号增强剂-1	1 套
P10001	LUNA™ 打印机	1 套

注：上述资料根于厂家英文版资料，结合 AI 工具翻译，最后经本公司技术人员整理而成，如内容有出入，请以英文版为准。



www.Logosbio.com



北京东胜创新生物科技有限公司

地址：北京市海淀区马连洼北路 138 号院 1 号楼 4 层 428

网址：www.eastwin.com.cn

电话：010-51663168