

水中のバクテリア生死判別方法

SYBR® Greenと PI を用いた水中バクテリア解析方法

近年、フローサイトメーター (FCM) を用いた細菌数カウントの標準化測定法は、水質分析に關与するヨーロッパ中14の研究室で詳細に検討され、Swiss Food Bookの水質分析における推奨標準プロセスとして採用されています。膜透過性蛍光物質であるSYBR® Greenで水中のバクテリアを蛍光標識し、その蛍光散乱特性を用いてFCMにて解析することが可能になりました。スイス連邦公衆保健省もこの全バクテリア数を測定する手法を推奨しています。従来からの寒天培地上で増殖するバクテリアを対象とした方法 (Heterotrophic Plate Count) と比べ、このFCMを用いた測定法は、生死判定と同時に全バクテリアを迅速にカウントすることが可能であり、より簡便で信頼性の高い手法となっています。SYBR® Greenと非膜透過性DNAインターカレーターであるPI (Propidium Iodide) を用い、水中のバクテリアの生死判定も同時に行うことが可能です。

試薬・装置

- ・ SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies) : 10,000x
- ・ Hypochlorite SolutionI (Sysmex : AU668623)
- ・ Cleaning Solution (Sysmex : AE454494)
- ・ Calibration Beads 0.5 μm (Sysmex : BT566408)
- ・ DMSO (Dimethyl sulfoxide) 用フィルター: IC Millex_LG (0.2 μm) (Millipore, SLLGC25NS)
- ・ 希釈用水 : 超純水 (NANOpure) もしくは0.22 μm filterでろ過したミネラルウォーター (Evian, Vittel)
- ・ 水ろ過用フィルター:
Millex GV (0.22 μm) (Millipore, SLGV033RB) /Millex GP (0.22 μm) (Millipore, SLGP033RB)
- ・ フローサイトメーター
対応可能機種 : CyFlow Cube 8 /Cube 6 など488 nm青色レーザーを装備しているFCMを使用。

蛍光色素	検出器・フィルター構成
SYBR® Green I	FITC検出用フィルター (FL1 : 530/30 nm etc.)
PI	PI 検出用フィルター (FL3 : > 610 nm etc.)

サンプル準備

SYBR® Green I および PI 保存溶液の調製

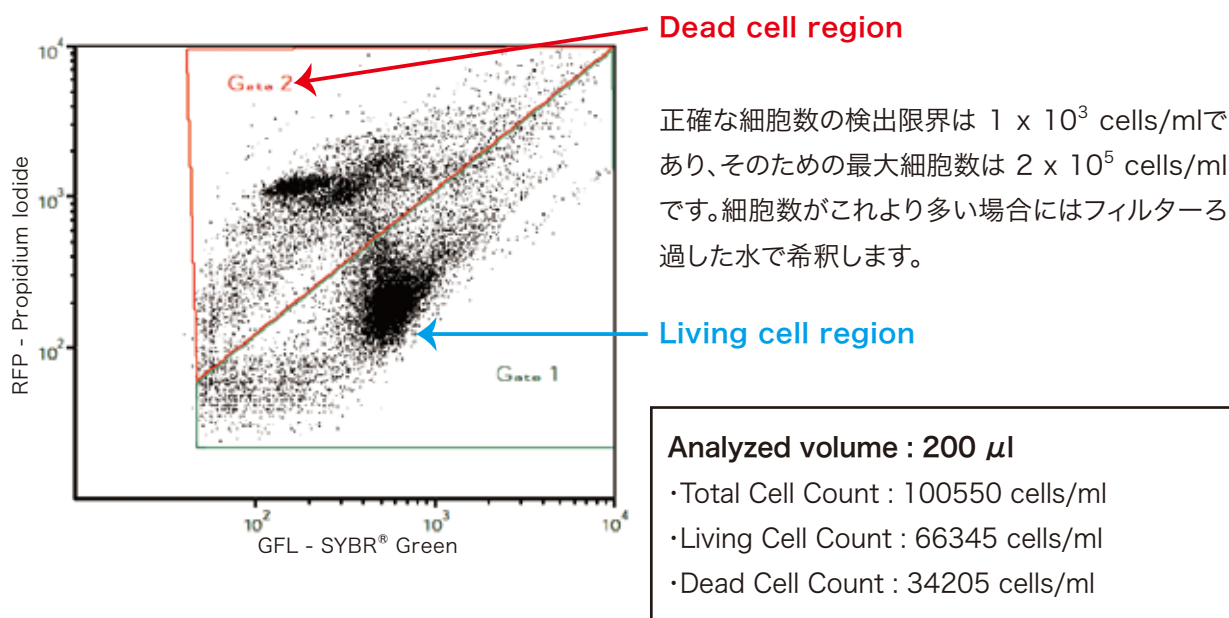
SYBR® Green I (10,000x) をフィルターろ過したDMSOにて100倍に希釈し、 -20°C で保存します。DMSOにて30 mM PI 溶液を作成 (20.05 mg PI にDMSO 1 mlを加える) し、調製した保存液を使用する細胞濃度にあわせてmixtureを調製しておきます。(mixture は -20°C で保存可)

サンプル細胞濃度	PI stock	SYBR® Green I stock
10 ³ - 10 ⁴ cells/ml	1 μl	1 ml
10 ⁴ - 10 ⁶ cells/ml	5 μl	1 ml
10 ⁶ - 10 ⁷ cells/ml	10 μl	1 ml

サンプルの染色

SYBR® Green /PI staining mixture 10 μlを 990 μlのサンプル水と混合し、遮光下にて37 °Cで10分間のインキュベーション後10分以内に測定します。(長時間のPI 染色は測定結果に影響を及ぼします)

フローサイトメーターによる解析



バクテリアの大きさは約1 μmとされており、通常の体細胞に比べ非常にサイズが小さいため、デブリなどのバックグラウンドと明確に区別する必要があります。測定前の流路クリーニングを十分に行うことにより正確なデータを得ることができます。

関連試薬製品

製品番号	製品名	容量・サイズ
AU668623	Hypochlorite Solution	250 mL
AE454494	Cleaning Solution	250 mL
BT566408	Calibration Beads 0.5 μm Concentrate	10 mL

発行：シスメックス株式会社 R&I事業本部 事業企画部 細胞計測事業推進課

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-991-2091 Fax 078-997-9976
東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557

<http://www.sysmex-fcm.jp>

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。