

# 細菌の生/死細胞数測定 – CyStain BacCount Viable –

アプリケーションレポート Vol.25

本アプリケーションレポートでは、CyStain BacCount ViableとフローサイトメーターCyFlow Cube 6を用いた細菌の生/死細胞数測定の例をご紹介します。CyStain BacCount Viableに含まれるCyStain Greenは、細胞膜透過性のDNA染色色素で、細胞膜の状態に関わらず全ての細菌の核DNAを染色します。一方、CyStain Redは、細胞膜非透過性のDNA染色色素で、細胞膜が損傷した細菌(死菌)にのみ透過し、核DNAを染色します(図1)。また、CyFlow Cube 6では、2本のプラチナ電極(スタート電極とストップ電極)を用いて正確に一定量(200  $\mu$ l)のサンプルを測定し細胞数をカウントすることができます(TVAC, True Volumetric Absolute Counting)。

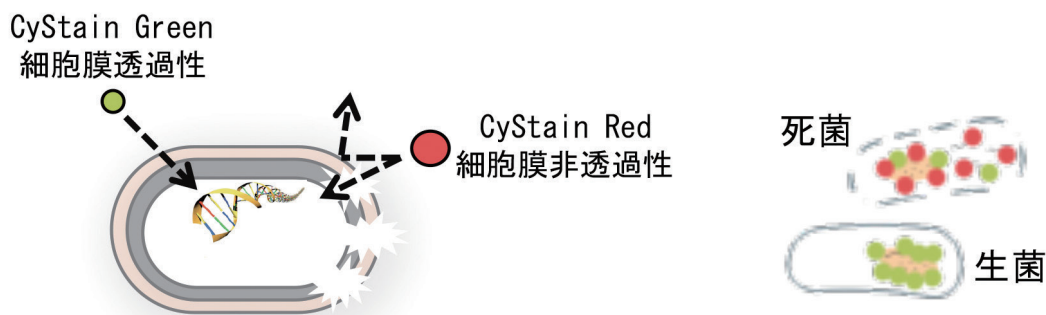


図1. CyStain BacCount Viableでの細菌の生死判定

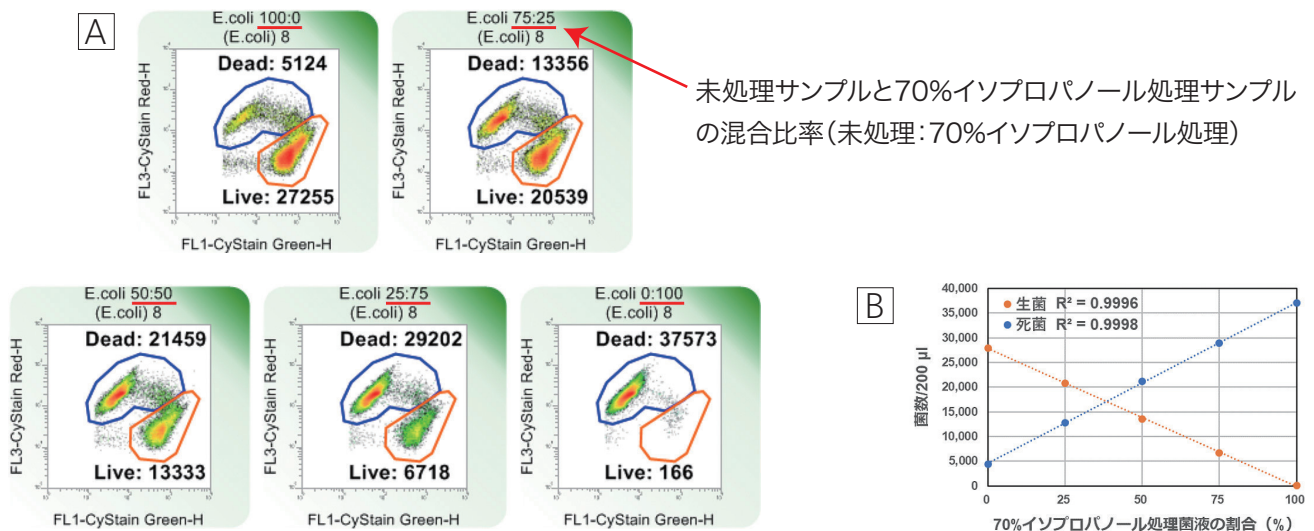


図2. Cystain BacCount ViableとCyFlow Cube 6を用いた細菌数測定と線形回帰分析

(A) 未処理と70%イソプロパノールで30分間処理した大腸菌 (*Escherichia coli*) を様々な比率で混合した細菌懸濁液をCyStain BacCount Viableで染色し、CyFlow Cube 6の絶対数カウント機能(TVAC)を用いて測定しました。

(B) 3回の測定結果の生菌数と死菌数の平均値をプロットし、線形回帰分析を行いました。その結果、生菌 ( $R^2=0.9996$ )、死菌 ( $R^2=0.9998$ ) とともに精度の高い回帰直線が得られました。

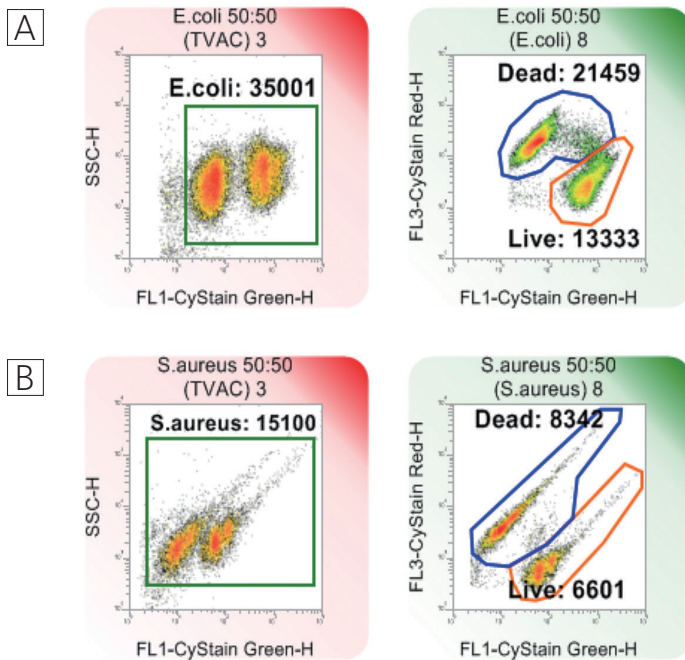


図3. CyFlow Cube 6を用いた細菌の生/死菌数測定(CyStain BacCount Viable)

未処理と70%イソプロパノールで30分間処理した細菌を混合した細菌懸濁液をCyStain BacCount Viableで染色し、CyFlow Cube 6で測定しました。グラム陰性菌(大腸菌)、グラム陽性菌(黄色ブドウ球菌)ともに、生菌と死菌を明確に分離することができました。

- A. 大腸菌(グラム陰性菌、*Escherichia coli*)、  
B. 黄色ブドウ球菌(グラム陽性菌、*Staphylococcus aureus*)

### サンプル調製・測定

1. ディスポールでコロニーを掻き取り、3 mlの0.85% NaClに懸濁します。
2. CellTrics 30  $\mu\text{m}$ でろ過した後、未処理と殺処理用に1 mlずつ分注します。
3. 室温、10,000xgで3分間遠心し、上清を捨てます。
4. ペレットを1 mlの0.85% NaCl(未処理)または70%イソプロパノール(殺処理)で懸濁し、室温で30分間静置します。
5. 室温、10,000xgで3分間遠心し、上清を捨てます。
6. ペレットを1 mlの0.85% NaClで懸濁後、室温、10,000xgで3分間遠心し、上清を捨てます。
7. 0.85% NaClに再懸濁し適当な細胞濃度( $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ 細菌/ml)に調整します。
8. CyStain BacCount Viableの添付文書に従って染色します。
9. CyFlow Cube 6のサンプル流速を2  $\mu\text{l}/\text{sec}$ に設定し、絶対数カウント機能(TVAC)を用いてサンプル200  $\mu\text{l}$ 中の細菌数を測定します。

### 試薬・機器

- 05-5028 CyStain BacCount Viable (Sysmex、cat# CC618160)
- フローサイトメーター: CY-S 3060R\_N1 CYFLOW CUBE 6 (Sysmex、cat# BH047102)
- 04\_0042\_2316 CellTrics 30 $\mu\text{m}$  (Sysmex、cat# BP486257)

※ 使用の試薬・機器は医療機器ではありませんので、診断には使用できません。

※ 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。

お問い合わせ先

**シスメックス株式会社**

日本・東アジア地域本部 R&I事業推進部

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