

# 水中のバクテリア全細胞数カウント

## SYBR® Greenを用いた水中バクテリアのFCM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。

### 試薬・装置

- SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies) : 10,000x
- Hypochlorite Solution (Sysmex : AU668623)
- Cleaning Solution (Sysmex : AE454494)
- Calibration Beads 0.5  $\mu\text{m}$  (Sysmex : BT566408)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) 用フィルター : IC Millex\_LG (0.2  $\mu\text{m}$ ) (Millipore, SLLGC25NS)
- 希釈用水 : 超純水 (NANOpure) もしくは0.22  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ) (Millipore, SLGV033RB) /Millex GP (0.22  $\mu\text{m}$ ) (Millipore, SLGP033RB)
- フローサイトメーター  
対応可能機種 : CyFlow Cube 8 /Cube 6, Spaceなど488 nm青色レーザーを装備しているFCMを使用。

検出器・フィルター構成
SYBR® Green I : 最大励起 : 494 nm, 最大蛍光 : 521 nm ・緑色蛍光検出用 : FITC検出用フィルター (FL1 : 530/30 nm etc.)
・赤色蛍光検出用 : (FL3 : > 610 nm etc.)

### サンプル準備

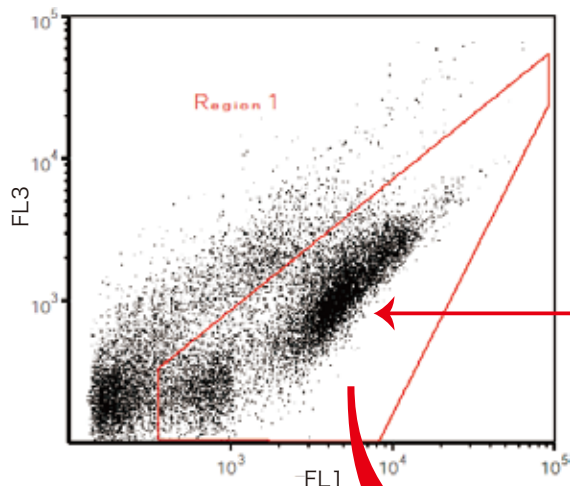
SYBR® Green I 保存溶液の調製

SYBR® Green I (10,000x) をろ過したDMSOにて100倍に希釈します。(−20 °Cで保存可能)

サンプルの染色

100倍希釈されたSYBR® Green I 保存液10  $\mu\text{l}$ を990  $\mu\text{l}$ のサンプル水と混合し、遮光下にて37 °C (+/−2 °C)で10分間のインキュベーションを行います。

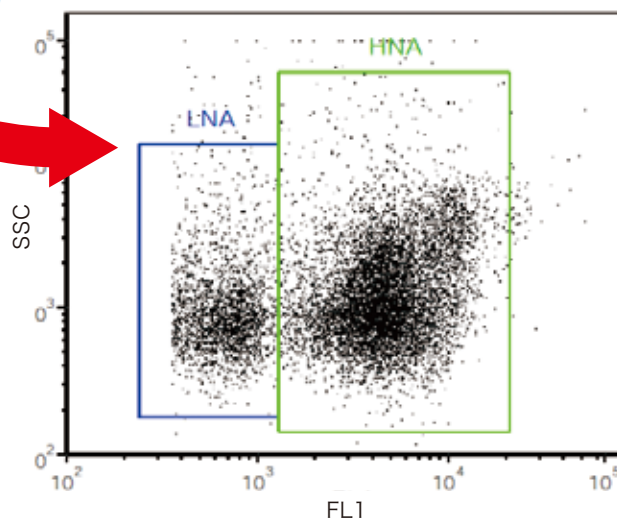
## フローサイトメーターによる解析



正確な細胞数の検出限界は  $1 \times 10^3$  cells/ml であり、そのための最大細胞数は  $2 \times 10^5$  cells/ml となります。細胞数がこれより多い場合にはフィルターを過した水で希釈します。

← バクテリアの集団 : Region 1

Analyzed volume : 200  $\mu$ l  
 Counted Region 1 : 12064 cells per 200  $\mu$ l  
 ・Total Cell Count : 60320 cells/ml  
 ・HNA Cell Count : 46860 cells/ml  
 ・LNA Cell Count : 12835 cells/ml



バクテリアの大きさは約  $1 \mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 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.sismex-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。