

細菌の生/死細胞数測定—CyStain BacCount Viable—

CyStain BacCount Viableは、2種類の蛍光色素を使用することで生菌と死菌を識別します。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、DNAを染色します(図1)。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 RF-500を用いた細菌の生/死細胞数測定の例をご紹介します。

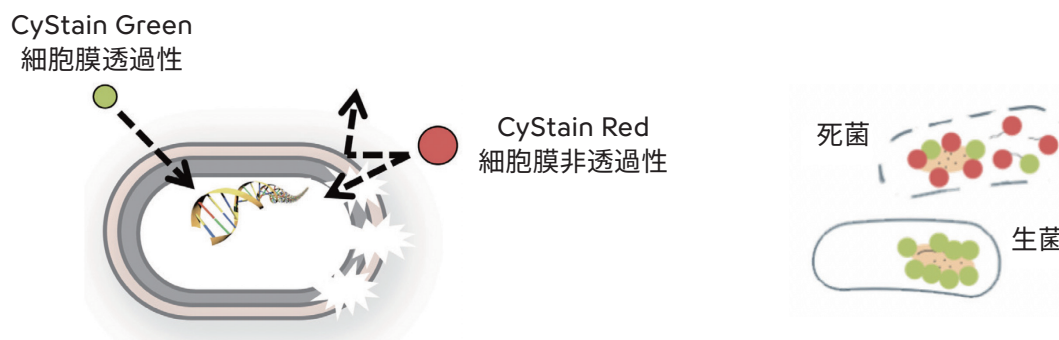


図1. CyStain BacCount Viableでの細菌の生死判定

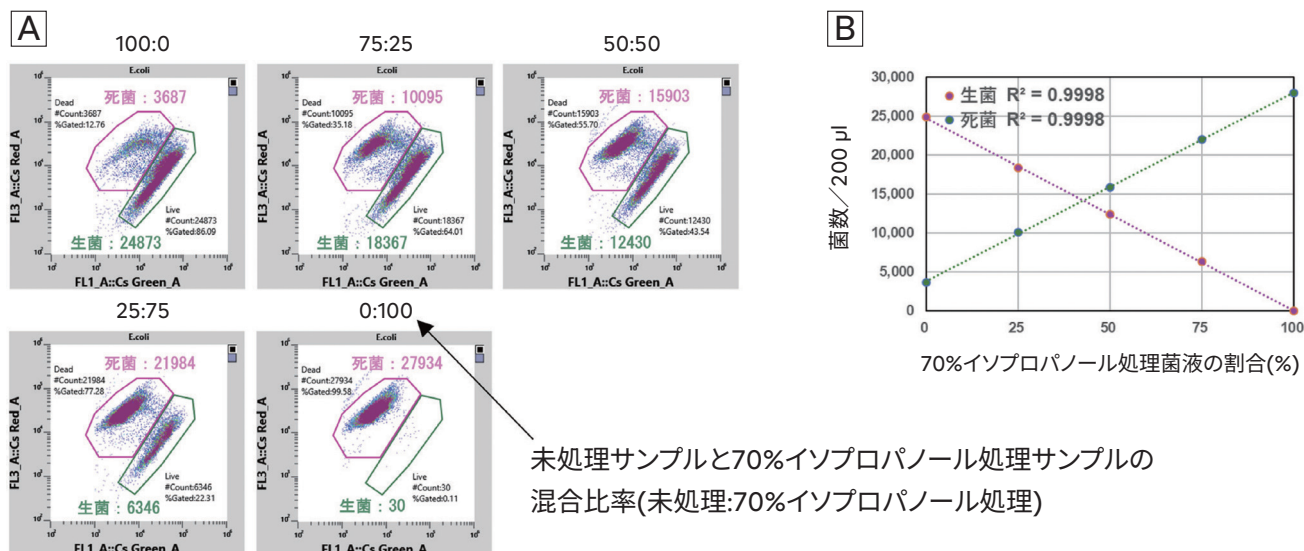


図2. Cystain BacCount ViableとRF-500を用いた生/死菌数測定

(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、RF-500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($R^2=0.9998$)、死菌($R^2=0.9998$)ともに精度の高い回帰直線が得られました。

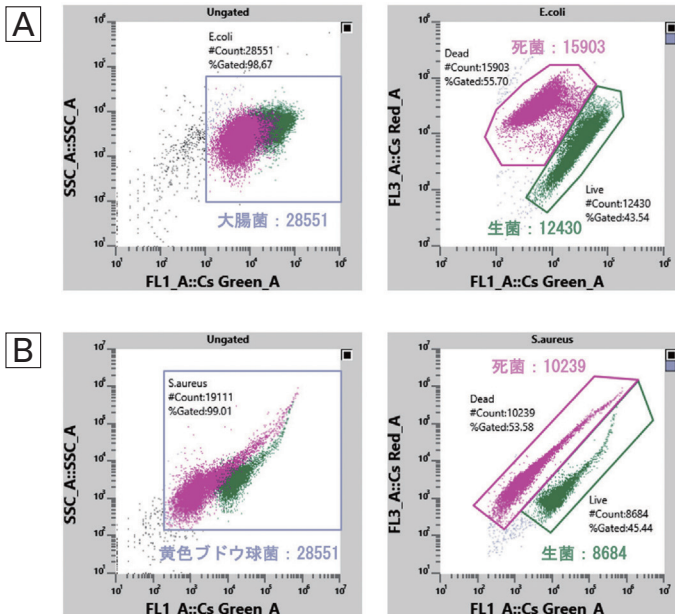


図3. グラム陰性菌(大腸菌)とグラム陽性菌(黄色ブドウ球菌)の生/死菌判別

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、フローサイトメーターRF-500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 μm 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、10,000 $\times g$ 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、10,000 $\times g$ 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、10,000 $\times g$ 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. フローサイトメーター RF-500で測定します。

試薬・機器

- CyStain BacCount Viable(Sysmex, cat# CC618160)
- CellTrics 30 μm (Sysmex, cat# BP486257)
- フローサイトメーター RF-500(Sysmex, cat# BF209548)

※ 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。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業推進部

神戸 神戸市西区室谷 1-3-2 〒651-2241

東京 東京都品川区大崎 1-2-2 〒141-0032

sysmex-fcm.jp