

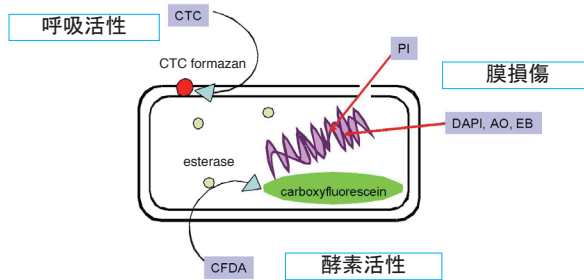
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)

Technical Manual

はじめに

-Bacstain- series は細菌用の蛍光染色試薬群です。下図に示す異なる3つの手法により菌の生存率を求める事が可能です。CTCは菌の呼吸活性により還元を受け、蛍光性 formazan を生成します。生菌に選択的な蛍光色素として、多く用いられています。

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit はエンハンサーの効果により、従来のCTC染色をより迅速・高感度に行えるキットです。



キット内容

CTC (5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride) 10 mg × 3
Enhancing reagent A 100 µl (DMSO solution) × 1

保存条件

0-5 °C にて保存して下さい。

キット以外に必要な物

- インキュベーター - マイクロピペット (20 µl, 1,000 µl)
- Flow cytometer (488 nm laser, red emission filter)

染色手順

1. CTC の入ったチューブ 1 本に対し、滅菌水 750 µl を加え良く混合し CTC を溶解する。
この時 CTC の濃度は 50 mmol/l となる。^{a)}
2. 菌を PBS(-) もしくは生理食塩水に懸濁し、細胞密度を調整する。10⁶ cells/ml (flow cytometry) .^{b)}
3. 細胞懸濁液 1 ml に対し、下表に示された量の試薬を加え、ボルテックスミキサーで混合する。

	CTC solution	Enhancing reagent A
Flow cytometry	20 µl	1 µl

4. 37 °C にて 30 分間インキュベートする。^{c)}
5. フローサイトメーターで観察する。

- a) 溶解後の CTC 溶液は -20°C で 2 週間保存可能です。
b) 染色時に培地成分が残っていると、CTC の非特異的な還元反応が起こりますので、染色前は PBS(-) や生理食塩水で洗浄後、置換して下さい。
c) CTC による染色効率が良くない場合は、CTC 溶液を追加するかインキュベーション時間を長くして下さい。
CTC 溶液を追加される場合は細胞懸濁液 1 ml に対し、最大添加量を 100 µl / サンプル までとして下さい。

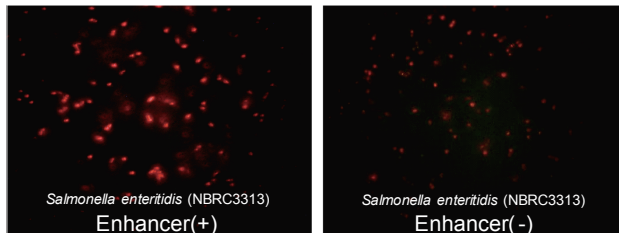
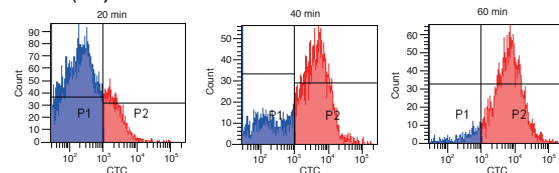


写真 (右) : Enhancing reagent なし
写真 (左) : Enhancing reagent あり

励起フィルター : B 励起

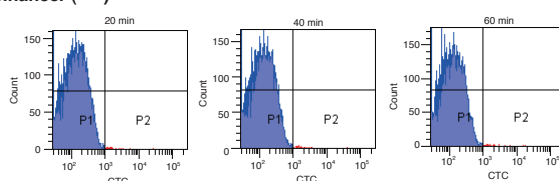
Enhancing reagent の添加により CTC 染色能が大きく向上します。

Enhancer (+)



上段 : Enhancing reagent あり
下段 : Enhancing reagent なし

Enhancer (-)



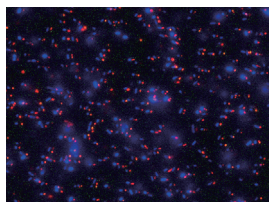
X 軸 : CTC formazan の蛍光強度

従来の CTC 染色 (下段) では検出されない *Candida albicans* の活性が、本キット (上段) では確認できます。

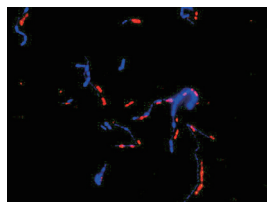
CTC 染色した *Candida albicans* のフローサイトメトリー解析

二重染色 (オプション)

CTCに対するカウンター染色試薬として *-Bacstain-* DAPI solution を用いる事ができます。DAPIは膜損傷の有無に関わらず、細胞内透過し核酸を染色します。DAPIで存在する全ての菌を、その内呼吸活性を有する菌をCTCで染色できます。DAPI染色時にはホルマリン固定(1~4%)を特に必要としませんが、固定を行う場合はCTC染色後に行ってください。DAPI染色時はCTCで染色した細胞懸濁液1mlに対し、1μlの *-Bacstain-* DAPI solutionを加え、室温で5分間インキュベートした後、蛍光観察して下さい。



CTC/DAPI 二重染色 (*E. coli*)



CTC/DAPI 二重染色 (*L. casei*)

アッセイ数

本マニュアルに準じた場合、約100検体分の測定が可能です。

参考文献

- 1) A. Hiraishi and N. Yoshida, "An Improved Redox Dye-Staining Method Using 5-Cyano-2, 3-Ditoyl Tetrazolium Chloride for Detection of Metabolically Active Bacteria in Activated Sludge", *Microbes Environ.*, **2004**, 19(1), 61.
- 2) A. Kitaguchi, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Enumeration of Respiring Pseudomonas spp. in Milk within 6 Hours by Fluorescence In Situ Hybridization Following Formazan Reduction", *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71(5), 2748.

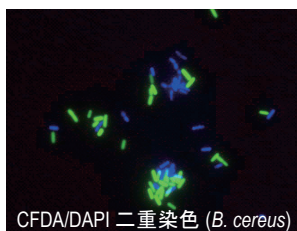
関連製品

-Bacstain- CFDA solution

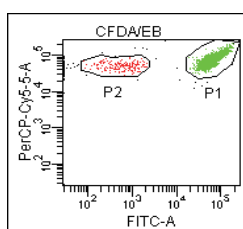
CFDAはエステラーゼ活性により蛍光を発する色素として、菌染色で広く用いられています。

-Bacstain- CFDA solutionはCFDAをDMSO溶液としていますので、調製の手間無くご使用頂けます。

CFDAはそれ自体では蛍光を持ちませんが、細胞内に存在するエステラーゼにより蛍光性のカルボキシフルオレseinとなります。



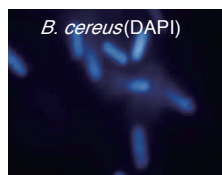
CFDA/DAPI 二重染色 (*B. cereus*)



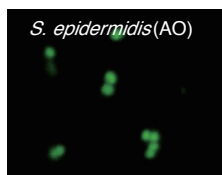
CFDA/EBによる *S. epidermidis* の二重染色
X軸: CFDAの蛍光強度
Y軸: EBの蛍光強度

-Bacstain- DAPI solution, AO solution, EB solution

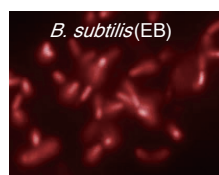
DAPI, AO及びEBは核酸染色試薬として頻用されます。膜損傷の有・無に関わらず細胞内に透過し、核酸を染色します。



B. cereus(DAPI)



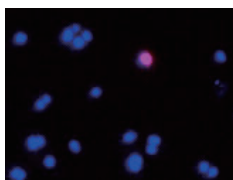
S. epidermidis(AO)



B. subtilis(EB)

-Bacstain- PI solution

PIは損傷した膜をもつ細胞にのみ透過し、核酸を染色します。



DAPI/PIによる *S. epidermidis* の二重染色
赤い蛍光を発しているのが膜損傷菌です。

Products	Code	Maximum Ex/Em(nm)	Number of assays
CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)	BS01	430, 480/630	100
CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)	BS02	430, 480/630	100
CFDA solution	BS03	493/515	100
DAPI solution	BS04	360/460	100
AO solution	BS05	420 ~ 460/630 ~ 650(ssDNA) 500/520(dsDNA)	100
EB solution	BS06	520 ~ 525/615	100
PI solution	BS07	530/620	100

これらは福岡県工業技術センター生物食品研究所との共同開発製品です。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
Tel:096-286-1515(代表) Fax:096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト(東京)
東京都港区芝大門2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel: 03-3578-9651(代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル: 0120-489548
フリーファックス: 0120-021557

BS01: *-Bacstain-* CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)