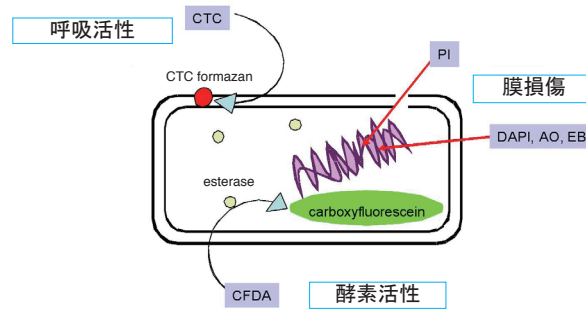


はじめに

-Bacstain- series は細菌用の蛍光染色試薬群です。異なる3つの手法（下図）から菌の生存率を求める事ができます。



Acridine orange (AO) は環境微生物の研究分野において、存在する菌を計数するために用いられてきました。AO は dsDNA と結合して緑色の蛍光 ($\lambda_{ex}=502\text{ nm}$, $\lambda_{em}=526\text{ nm}$) を発し、ssDNA や RNA と結合した際は赤色の蛍光 ($\lambda_{ex}=460\text{ nm}$, $\lambda_{em}=650\text{ nm}$) を発します。

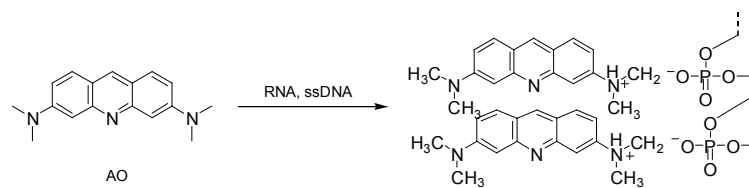


図 1. RNA や ssDNA 染色のメカニズム

キット内容

AO 水溶液 (75 μl \times 4 本, 濃度 : 1 mg/ml)

保存条件

ご使用時以外は -20°C 以下で保存して下さい。

キット以外に必要な物

- Flow cytometer (488 nm laser, green emission filter, red emission filter)
- または 蛍光顕微鏡 (blue emission filter, green emission filter, red emission filter)
- マイクロピペット (20 μl , 1,000 μl)

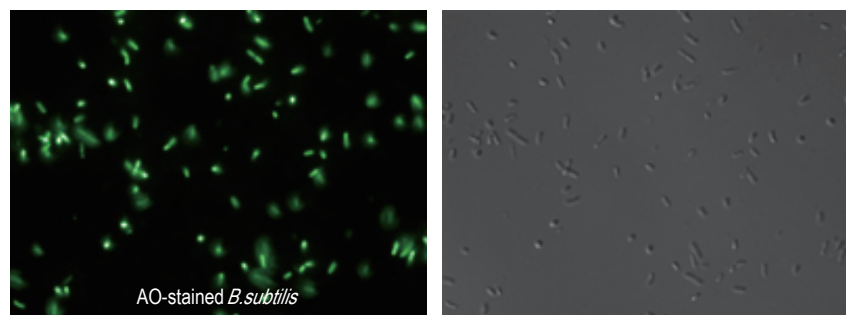
使用上の注意

- 本キットには溶液の入ったマイクロチューブのコンポーネントが含まれています。チューブ内壁やキャップに溶液が付着していることがありますので、開封前に振り落としてからご使用ください。

染色手順

1. 冷凍された AO 溶液を室温にて 30 分間静置し融解する。この際、遮光を行なうこと。^{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) 10⁸-10⁹ cells/ml (microscopy)
3. 細胞懸濁液 1 ml に対し、AO 溶液 3 μl を加え良く混合する。
4. 室温にて 5 分間インキュベートする。
5. フローサイトメーターまたは蛍光顕微鏡で観察する。

a) AO は変異原性が疑われるため、操作及び廃棄には注意が必要である。



左 : 蛍光像
右 : 明視野像

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

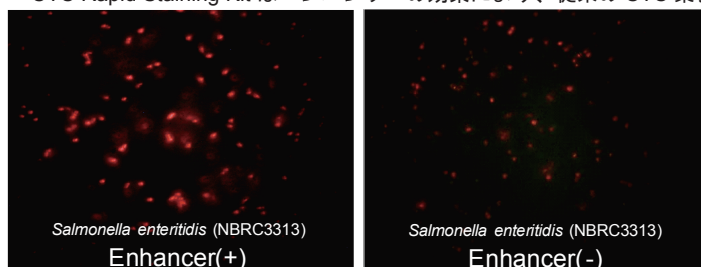
- 1) J. E. Hobbie *et al.*, "Use of Nucleopore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy", *Appl. Environ. Microbiol.*, **1977**, 1225.
- 2) S. F. Nishino, "Direct Acridine Orange Counting of Bacteria Preserved with Acidified Lugol Iodine", *Appl. Environ. Microbiol.*, **1986**, 602.

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

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)

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。



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

励起フィルター: B 励起

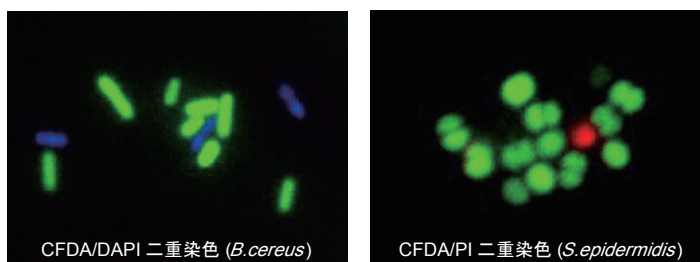
Enhancing reagent の添加により CTC 染色能が大きく向上します。

-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。

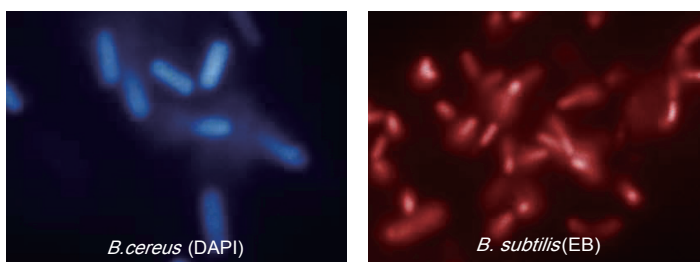
-Bacstain- CFDA solution は CFDA を DMSO 溶液としていますので、調製の手間無くご使用頂けます。

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セインとなります。



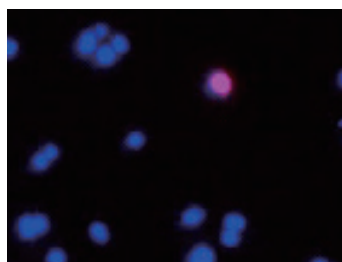
-Bacstain- DAPI solution, EB solution

DAPI 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。



-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	450, 480/630	100
CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)	BS02	450, 480/630	100
CFDA solution	BS03	493/515	100
DAPI solution	BS04	360/460	100
AO solution	BS05	420-460/630-650(ssDNA)	100
		500/520(dsDNA)	
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。