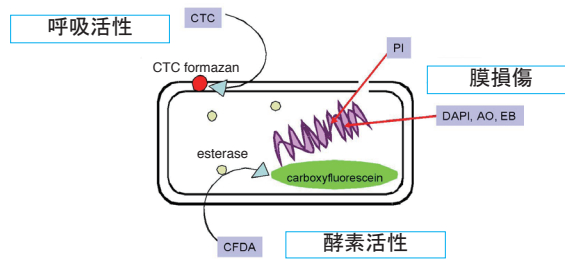


はじめに

-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。Ethidium bromide (EB) は核酸を染色する蛍光色素です。膜損傷に関わらず、菌の染色が可能です。EB-DNA 結合体の極大励起波長は 518 nm であり極大蛍光は 605 nm です。



キット内容

EB 溶液 (250 μ l \times 4、濃度 : 1 mg/ml)

保存条件

-20°C 以下で保存して下さい。

キット以外に必要な物

- 蛍光顕微鏡 (blue or green excitation filter, red emission filter)
- または Flow cytometer (488 or 533 nm laser, red emission filter)
- マイクロピペット (20 μ l, 1,000 μ l)

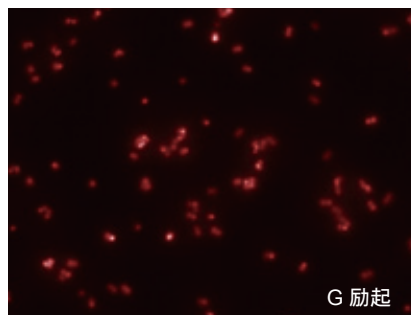
使用上の注意

- 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 EB 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、EB 溶液 10 μ l 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) EB 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。



EB 染色した *S.epidermidis*



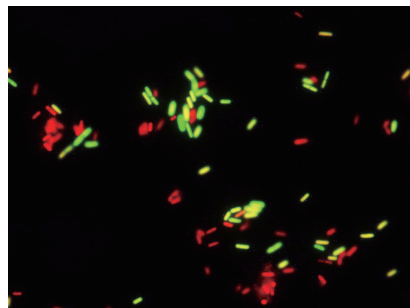
左 : 蛍光像
右 : 明視野像

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。

二重染色例

EB を -Bacstain- CFDA solution と組み合わせる事で二重染色が可能です。



B.cereus を -Bacstain- CFDA solution で染色した後、
-Bacstain- EB solution で対比染色した。

参考文献

- 1) T. Someya *et al.*, "Fluorescence Direct Count of Bacteria in Various Manures and Composts as Compared with Plate Count (Program for 2005 Annual Meeting of Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition)", *Journal of the science of soil and manure, Japan*, **2005**, 76(4), 401.

-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・高感度にできるキットです。

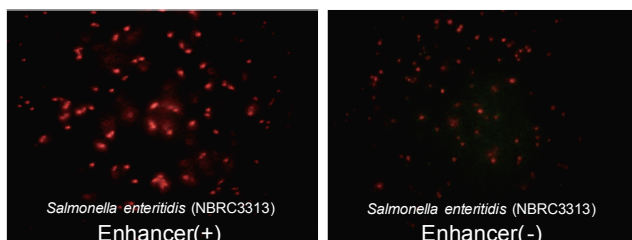


写真 (右) : Enhancing reagent なし
写真 (左) : Enhancing reagent あり

励起フィルター : B 励起

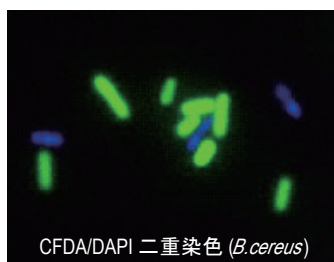
Enhancing reagent の添加により CTC 染色能が大きく向上します。

-Bacstain- CFDA solution

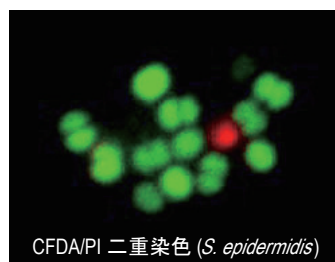
CFDA はエステラーゼ活性により蛍光を発する色素として、菌染色で広く用いられています。

-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。



CFDA/DAPI 二重染色 (*B. cereus*)



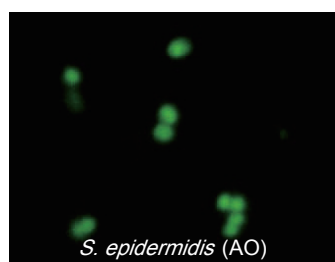
CFDA/PI 二重染色 (*S. epidermidis*)

-Bacstain- DAPI solution , AO solution

DAPI 及び AO は核酸染色試薬として汎用されます。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。



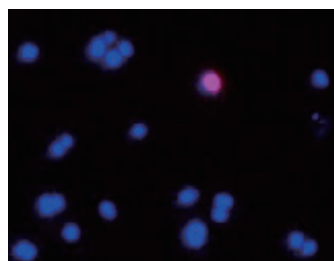
B. cereus (DAPI)



S. epidermidis (AO)

-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)	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。

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

BS06: -Bacstain- EB solution