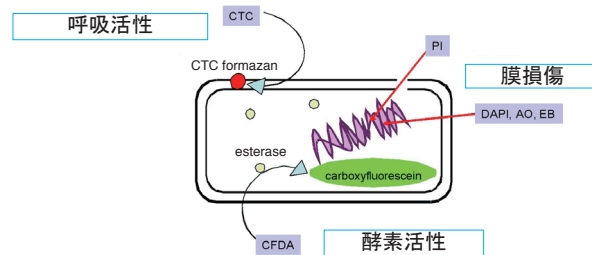


はじめに

-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。CFDA は細胞内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。CFDA はそれ自体では蛍光を持ちませんが、細胞内でエステラーゼにより分解され蛍光性のカルボキシフルオレセイン (λ_{em} 515 nm) となります。-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。



キット内容

CFDA DMSO 溶液 (375 μ l \times 4, 10 mg/ml)

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

- Flow cytometer (488 nm laser, green emission filter)
- 蛍光顕微鏡 (blue excitation filter, green emission filter)
- インキュベーター
- マイクロピペット (20 μ l, 1,000 μ l)

プロトコール染色手順

1. 凍結した CFDA 溶液を融解するため、室温にて 30 分間静置する。この際、遮光を行なうこと。
2. 菌を PBS(-) もしくは生理食塩水^{a)} 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、下表に示された量の CFDA 溶液を加えて混合する。

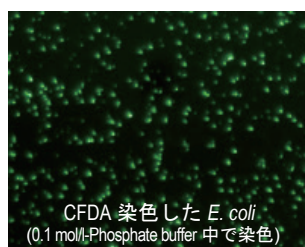
	Microscopy	Flow cytometry
CFDA solution	15 μ l	5 μ l

4. 37 °C にて 5 分間インキュベーションする^{b)}。
5. ホルムアルデヒド (終濃度 1-4%) を用いて細胞を固定化する。
6. 遠心もしくは濾過によりバッファーを除去し、新たなバッファーで再懸濁する。
7. フローサイトメーターまたは蛍光顕微鏡で観察する。

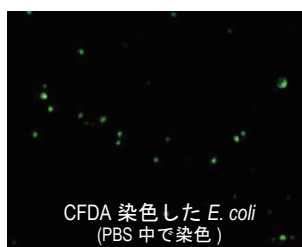
a) 下図に示すようにグラム陽性菌に比べグラム陰性菌は CFDA で染色されにくい傾向にあります。細胞外膜の存在により CFDA が細胞内に透過されにくいからです。グラム陰性菌を染色される際は、下に示しております 0.1 mol/l のリン酸バッファーを使用されることを推奨します。

0.1 mol/l-Phosphate buffer (pH8.5, 5%(w/v)-NaCl, 0.5 mmol/l-EDTA disodium salt)

b) CFDA による染色が十分に確認されない場合は、インキュベーション時間を長くしてください。



CFDA 染色した *E. coli*
(0.1 mol/l-Phosphate buffer 中で染色)

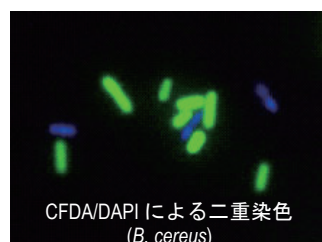


CFDA 染色した *E. coli*
(PBS 中で染色)

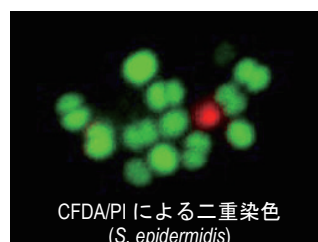
染色バッファーの違いにより CFDA 染色効率は大きく異なります。

二重染色

-Bacstain- DAPI solution または -Bacstain- PI solution を用いることにより CFDA との二重染色が可能です。



CFDA/DAPI による二重染色
(*B. cereus*)



CFDA/PI による二重染色
(*S. epidermidis*)

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。

- 1) N. Yamaguchi and M. Nasu, "Flow cytometric analysis of bacterial respiratory enzymatic activity in the natural aquatic environment", *J. Appl. Microbiol.*, **1997**, *83*, 43.
- 2) M. Kawai, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process", *J. Appl. Microbiol.*, **1999**, *86*, 496.
- 3) 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・高感度にてできるキットです。

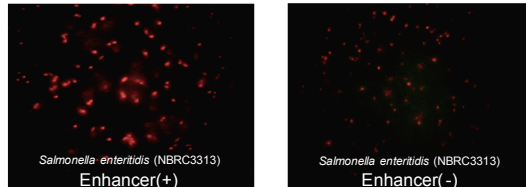
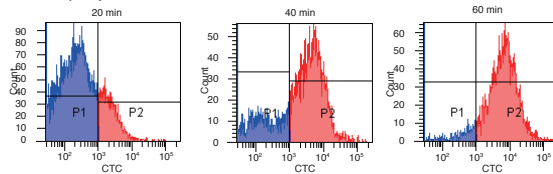


写真 (右) : Enhancing reagent なし
写真 (左) : Enhancing reagent あり

励起フィルター : B 励起

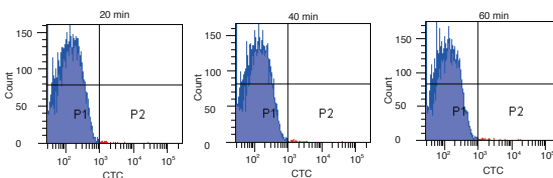
Enhancing reagent の添加により CTC 染色能が大きく向上します。

Enhancer (+)



上段 :
Enhancing reagent あり

Enhancer (-)



下段 :
Enhancing reagent なし

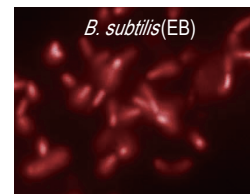
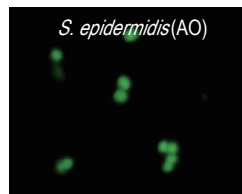
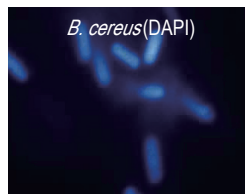
X 軸 :
CTC-formazan の蛍光強度

従来の CTC 染色 (下段) では検出されない活性がキットでは検出できます。

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

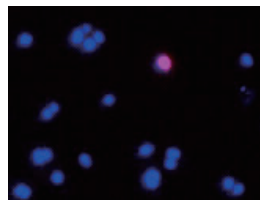
-Bacstain- DAPI solution, AO solution, EB solution

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・無にかかわらず、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	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