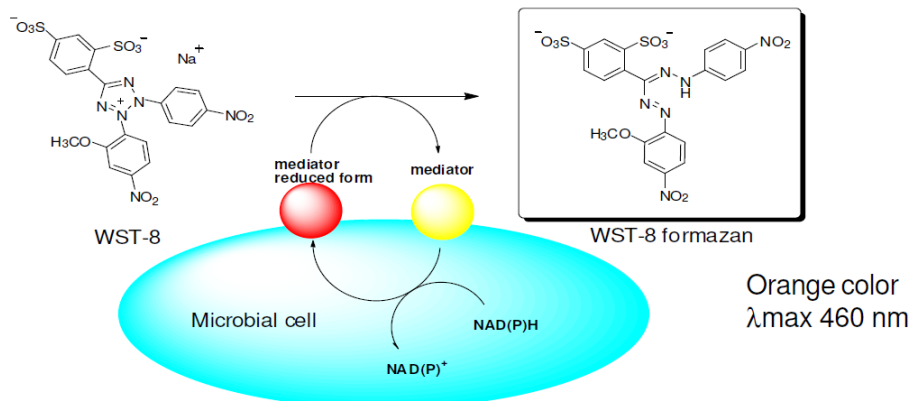


はじめに

NADH(NADPH)はエネルギー代謝活動に関与する補酵素であり、生命体の活動をつかさどっています。Microbial Viability Assay Kit-WSTはこの補酵素の還元能を利用する事で、微生物の代謝活性を比色検出します。還元発色試薬 WST-8は mediator を介し有色の formazan へと還元されます。吸光度と生成する formazan 量との間には比例関係が見られるため、吸光度を測定することで微生物の代謝活性を求めることができます。本キットには測定に必要な試薬が全て含まれており、簡便にかつ短時間に測定することができます。



キット内容

	100 tests	500 tests
WST solution	1 ml x 1	1 ml x 5
Electron mediator reagent (DMSO solution)	0.1 ml x 1	0.5 ml x 1

保存条件

0-5°Cにて保存してください。

必要なもの (キット以外)

- プレートリーダー (450-490 nm の吸光フィルター)
- 96 穴マイクロプレート
- インキュベーター
- マイクロピペット (10 µl, 200 µl) 及びマルチチャンネルピペット (200 µl)
- 1.5 ml チューブ

使用上のご注意

- 還元剤が存在すると WST-8 が還元され、バックグラウンドが上昇することがあります。還元能のある薬剤を用いる場合は、薬剤自身による発色の有無を確認してください。
- 気泡は測定値のバラツキの原因となりますので、ご注意ください。
- 発色に要する時間は微生物種や代謝活性に依存します。
- 微生物によっては発色後、退色することがあります。

Viability Assay

発色試薬の調製

WST solution と Electron mediator reagent を 9 : 1 の比率で 1.5 ml チューブで混合する。

発色試薬は 0-5°C で保存して下さい。調製後、1 ヶ月は安定です。

*96 穴プレートの 1 well あたり 10 µl の発色試薬が必要です。検体数に応じ分注量を決定して下さい。

*グラム陽性菌または真菌の場合、Electron mediator reagent を DMSO または滅菌水にて 8 倍希釈したもので検出試薬を調製して下さい。グラム陰性菌はそのままの濃度でご使用頂けます。なお、一部のグラム陰性菌 (腸炎ビブリオ) で良好な発色が得られない場合がございますので、その場合はグラム陰性菌及び真菌用の検出試薬濃度でお試下さい。

生存率測定

1. 96 穴マイクロプレートの各ウェルに菌懸濁液 190 µl を播種する。
 2. 発色試薬を各ウェルに 10 µl ずつ添加する。
 3. インキュベーター内で培養する。
 4. マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。
- ※微生物を含まない培地をブランクとする。

本キットは下記の微生物において使用実績があります。

真菌 :

Candida utilis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*

グラム陽性菌 :

Bacillus cereus, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*

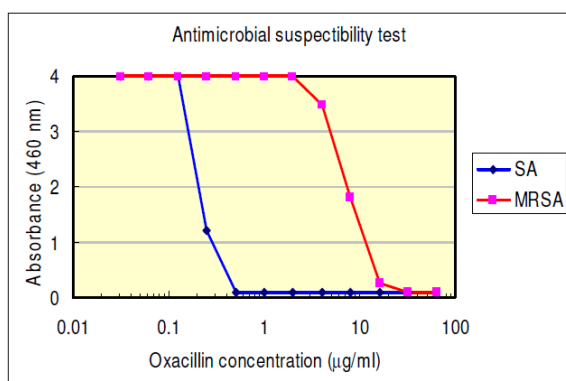
グラム陰性菌 :

Acetobacter sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*

1. 微生物を最適な培地で培養する。
2. 培養した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で OD₅₅₀ が約 0.125 (0.5 McFarland 相当) となるように希釈し、さらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し接種用菌液とする (約 10⁷ CFU/ml)。
3. WST solution と Electron mediator reagent を 9 : 1 の比率で 1.5 ml チューブで混合し、発色試薬を調製する。(発色試薬は調製後 4℃ 保存して下さい。1 ヶ月間は安定です。)
4. Ca 及び Mg イオン濃度調整済み Mueller-Hinton broth を用いて抗生物質 (被検物質) の 2 倍希釈系列を調製する。(例えば、64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 µg/ml)
5. 96 well プレートへ抗生物質含有 Mueller-Hinton broth 180 µl/well を分注する。
6. 各 well へ接種用菌液 10 µl を分注する (約 10⁵ CFU/well)。
7. 微生物に最適な温度で 6 時間インキュベーションする。
8. 発色試薬 10 µl/well を添加し、更に 2 時間インキュベーションする。
9. マイクロプレートリーダーを用い 450 nm の吸光度を測定する。

グラム陽性菌、酵母及び発色の悪い微生物 (腸炎ビブリオなど)

Electron mediator reagent を DMSO もしくは滅菌水にて 8 倍希釈して使用してください。



MIC (Oxacillin concentration µg/ml)		
	Microbial Viability Assay Kit-WST	Microdilution method
SA	0.5	0.5
MRSA	32	64

SA : *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (NBRC12732),

MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (FJCM8702)

参考文献

- 1) T. Tsukatani, H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe and K. Matsumoto, "Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salt", *Journal of Microbiological Methods*, **2008**, 75, 109.
- 2) T. Tsukatani, T. Higuchi, H. Suenaga, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe and K. Matsumoto, "Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances", *Analytical Biochemistry*, **2009**, 393, 117.

本キット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