

## 6 細菌研究用試薬

細菌研究用試薬は、菌増殖アッセイキット、菌染色キット、菌蛍光染色色素に分類した。

菌染色キットは菌染色蛍光色素として知られる CTC の染色性を高めキット化したものである。Flow cytometry 用、Microscopy 用の 2 種類を用意し、測定手段に応じて選択することが出来る。菌の蛍光検出は様々な手法で行われるため、目的に応じた蛍光色素をご活用いただきたい。

### 6-1 菌増殖アッセイキット

Microbial Viability Assay Kit-WST ..... 121

### 6-2 菌染色キット

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry) ..... 122

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy) ..... 123

### 6-3 菌蛍光染色色素

-Bacstain- CFDA ..... 124

-Bacstain- DAPI solution ..... 124

-Bacstain- AO solution ..... 125

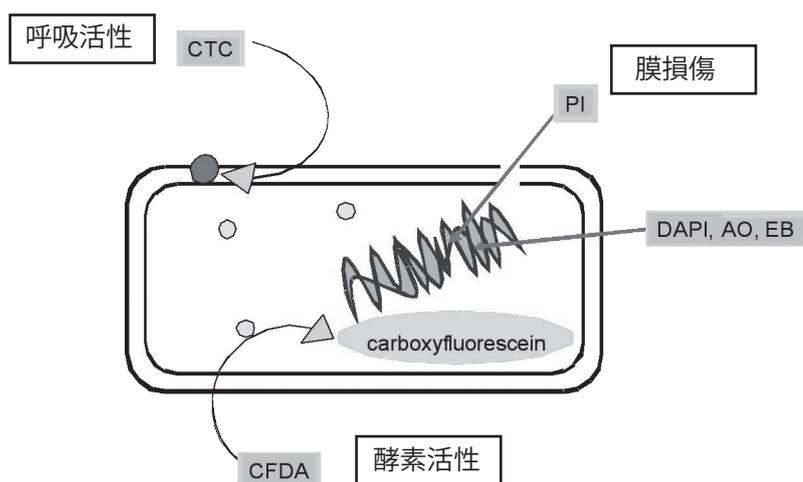
-Bacstain- EB solution ..... 125

-Bacstain- PI solution ..... 125

-Bacstain- シリーズは細菌用の蛍光染色試薬群である。

異なる 3 つの手法から菌の生存率を求める事ができる。

1) 膜損傷, 2) 細胞内酵素活性, 3) 呼吸活性



蛍光染色法による生死判定手法

表 色素の特性

色素名	検出	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	備考
CTC	蛍光	430, 480	630	細胞内呼吸活性により蛍光を発する。
CFDA	//	493	515	細胞内エステラーゼ活性により蛍光を発する。
DAPI	//	360	460	細胞の核酸と結合して蛍光を発する。
EB	//	520 ~ 525	615	細胞の核酸と結合して蛍光を発する。
PI	//	530	620	細胞の核酸と結合して蛍光を発する。
AO	//	420 ~ 460 500	630 ~ 650 (ssDNA) 520 (dsDNA)	DNA の二本鎖と一本鎖で蛍光特性が異なる。

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。  
社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

# 6-1 菌増殖アッセイキット

## Microbial Viability Assay Kit-WST

同仁品コード：M439  
100 tests ¥6,000  
500 tests ¥21,300

**Protocol:** 「生菌の代謝活性を測りたい」

**キット内容**

- WST solution 1 ml × 5 tubes
- Electron mediator reagent (DMSO solution) 0.5 ml × 1 tube

**取扱注意** 1. 危険物第四類 第三石油類 危険等級III  
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷蔵

**危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)**  
感嘆符



**性質** 水溶性テトラゾリウムである WST-8 (特許 2757348) を発色試薬として用いた微生物の比色検出キットである。

微生物はエネルギー代謝活動により細胞内に NAD(P)H を生成する。WST-8 は電子メディエーターを介する事で、この NAD(P)H により還元され、水溶性ホルマザン (オレンジ色) を生成する。このホルマザンの生成量は、微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、オレンジ色への呈色を見ることで、その微生物の生存率や活性度合を確認できる。

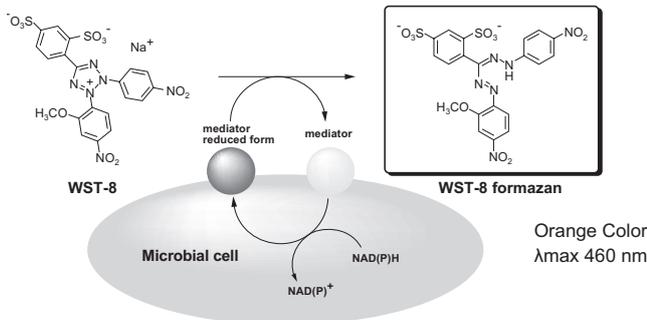
**特長**

- 1) 寒天培地法や微量液体希釈法に比べ短時間での検出が可能である。
- 2) マイクロプレートを使った多検体処理が可能である。
- 3) 培地成分による影響を受けにくい製品である。

本品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ある。

\* 使用方法は、プロトコルをご覧ください。

**発色原理**



**各種微生物における検出感度**

※ 微生物希釈液は標準寒天培地でも培養を行い、得られたコロニー数より細胞密度を決定した。

- 1) 培養した各微生物を標準液体培地 (pH 7.0) で希釈した。
- 2) 1 ウェル (96 ウェル-plate) あたり 190 μl の微生物希釈液を添加した。
- 3) 各ウェルに発色試薬 10 μl を添加し、30℃または 37℃でインキュベートした。
- 4) 1 時間後及び 4 時間後の吸光度 (460 nm : λ<sub>max</sub> WST-8 formazan) を測定した。

	微生物種	インキュベーション時間	
		1h	4h
Yeast	<i>Candida utilis</i>	5.53 × 10 <sup>7</sup>	6.18 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.70 × 10 <sup>5</sup>	2.65 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1.65 × 10 <sup>5</sup>	2.47 × 10 <sup>4</sup>
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	6.70 × 10 <sup>5</sup>	6.77 × 10 <sup>4</sup>
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.45 × 10 <sup>6</sup>	6.71 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.69 × 10 <sup>6</sup>	2.47 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.18 × 10 <sup>7</sup>	1.76 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Lactobacillus casei</i>	8.40 × 10 <sup>7</sup>	2.34 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5.07 × 10 <sup>6</sup>	6.46 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Micrococcus luteus</i>	8.29 × 10 <sup>5</sup>	1.29 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.78 × 10 <sup>6</sup>	2.71 × 10 <sup>5</sup>
Gram-negative bacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5.53 × 10 <sup>6</sup>	1.12 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Acetobacter sp.</i>	2.53 × 10 <sup>7</sup>	7.39 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	1.31 × 10 <sup>7</sup>	2.86 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.76 × 10 <sup>7</sup>	5.59 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Proteus mirabilis</i>	7.42 × 10 <sup>6</sup>	1.35 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.76 × 10 <sup>8</sup>	1.78 × 10 <sup>7</sup>
	<i>Salmonella enteritidis</i>	2.55 × 10 <sup>7</sup>	1.06 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.73 × 10 <sup>7</sup>	2.60 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Serratia marcescens</i>	7.15 × 10 <sup>7</sup>	5.08 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.90 × 10 <sup>7</sup>	1.03 × 10 <sup>7</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.92 × 10 <sup>7</sup>	5.46 × 10 <sup>6</sup>	

※ 表に示された細胞密度 (CFU/ml) は、発色試薬添加後 1 時間または 4 時間インキュベートし、得られた吸光度 (460 nm) が 0.5 以上であった各微生物毎の細胞密度 (CFU/ml) である。

**薬剤感受性試験への応用**

細菌を抗生物質を含む Mueller-Hinton 培地中で 6 時間 (35℃) インキュベートした後、発色試薬を添加し 2 時間 (35℃) 反応させた。各薬剤濃度において、発色が確認されなかった濃度を同キットにおける Minimum Inhibitory Concentration (MIC) とした。Microdilution method (日本化学療法学会標準法) では 22 時間のインキュベーション後に目視で MIC を求めるが、本キットを用いた場合、8 時間で Microdilution method と同等の MIC (μg/ml) を得ることができた。

抗生物質	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	
	Microbial Viability Assay Kit-WST	Microdilution method	Microbial Viability Assay Kit-WST	Microdilution method
Ampicillin	2	2 - 4	0.125	0.125 - 0.25
Cefotaximine	0.062 - 0.125	0.031 - 0.125	4	4
Chloramphenicol	8	16	8	8
Gentamicin	0.5 - 1	1	0.031	0.031 - 0.062
Ciprofloxacin	0.062	0.031 - 0.062	1	0.25

最新の情報は web へ [同仁化学 M439](#) で検索

## 6-2 菌染色キット

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

**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」

同仁品コード：BS01  
100 assays ¥21,900

**キット内容**

- CTC 10 mg × 3 tubes
- Enhancing reagent A 100 µl × 1 tube

- 取扱注意**
1. 危険物第四類第三石油類 危等III
  2. 医薬用外劇物 3. 火気厳禁
  4. 保存方法：冷蔵，遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)  
感嘆符



**性質** 呼吸活性を代表する電子伝達により細胞内に生じる NAD(P)H を検出する。CTC はこの NAD(P)H より還元され蛍光性ホルマザン  $\lambda_{ex}=430, 480 \text{ nm}$  付近、 $\lambda_{em}=620 \sim 640 \text{ nm}$  となる。この蛍光性ホルマザンは細胞に沈着して観察される事から、個々の細胞での観察が可能である。キットに含まれるエンハンサーは、NAD(P)H による CTC の還元反応を促進するため、高感度な検出が可能である。

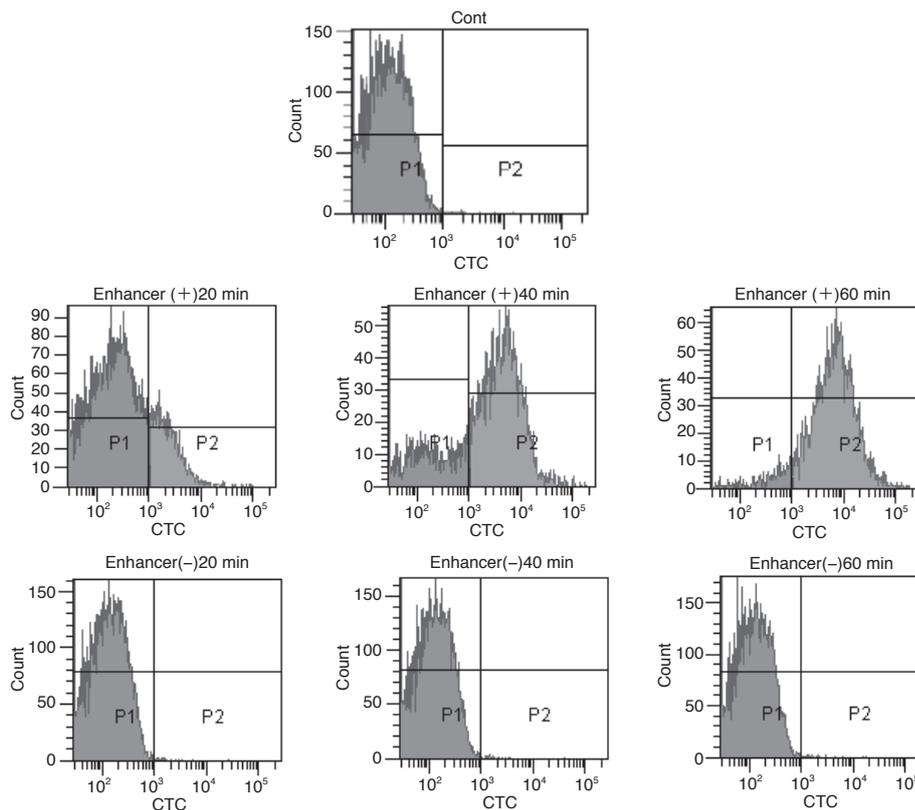
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit ( for Flow cytometry ) は、呼吸活性を指標とした生菌選択的蛍光試薬として汎用される CTC を高感度化し、Flow cytometry での解析に最適化したキットである。

**特長**

- 1) 従来の CTC 染色に比べ高感度な検出が可能である。
- 2) 少量小分け品であるため、試薬の調製が容易である。

※本品は、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ある。

\* 使用方法はプロトコルをご覧ください。



上段：Enhancing reagent あり  
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 *Candida albicans* の活性が、本キット（上段）では確認できる。

図1 CTC 染色した *Candida albicans* のフローサイトメトリー解析

最新の情報は web へ  で検索

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

- 細胞増殖/毒性
- 酸化ストレス
- 分子生物学
- 細胞内蛍光プローブ
- 細胞染色
- 細菌研究用試薬
- 膜タンパク質
- ラベル化剤
- 二価性試薬
- 酸化還元
- イオン電極
- シンチレーター
- 生化学用緩衝剤
- キレート
- 比色/金属試薬
- 水質分析用溶媒抽出
- 高純度溶媒
- その他
- 定性材料

**-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)**

Protocol: 「細菌を蛍光染色したい」

同仁品コード: BS02  
100 assays ¥21,300

## キット内容

- CTC 10 mg × 3 tubes
- Enhancing reagent B 500 µl × 1 tube

溶解例 CTC 15 mg/ml (水)

取扱注意 1. 医薬用外劇物, 2. 保存方法: 冷蔵, 遮光

**性質** 呼吸活性を代表する電子伝達により細胞内に生じる NAD(P)H を検出する。CTC はこの NAD(P)H より還元され蛍光性ホルマザン  $\lambda_{ex}=430, 480 \text{ nm}$  付近、 $\lambda_{em}=620 \sim 640 \text{ nm}$  となる。この蛍光性ホルマザンは細胞に沈着して観察される事から、個々の細胞での観察が可能である。キットに含まれるエンハンサーは、NAD(P)H による CTC の還元反応を促進するため、高感度な検出が可能である。

**-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)** は、呼吸活性を指標とした生菌選択的蛍光試薬として汎用される CTC を高感度化し、蛍光顕微鏡での解析に最適化したキットである。

## 特長

- 1) 従来の CTC 染色に比べ高感度な検出が可能である。
- 2) 少量小分け品であるため、試薬の調製が容易である。

※本品は、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ある。

\*使用方法はプロトコルをご覧ください。

## 参考文献

- 1) A. W. Coleman, "Enhanced Detection of Bacteria in Natural Environments by Fluorochrome Staining of DNA", *Limnol. Oceanogr.*, 1980, 25, 948.
- 2) E. Severin, J. Stellmach and H. M. Nachtigal, "Fluorimetric Assay of Redox Activity in Cells", *Anal. Chim. Acta*, 1985, 170, 341.
- 3) G. G. Rodriguez, D. Phipps, K. Ishiguro and H. F. Ridgway, "Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58(6), 1801.
- 4) G. Schaule, H. C. Flemming and H. F. Ridgway, "Use of 5-Cyano-2,3-ditoly Tetrazolium Chloride for Quantifying Planktonic and Sessile Respiring Bacteria in Drinking Water", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(11), 3850.
- 5) R. A. Bovill, J. A. Shalloross and B. M. Markey, "Comparison of the Fluorescent Redox Dye 5-Cyano-2,3-ditolytetrazolium Chloride with *p*-Iodonitrotetrazolium Violet to Detect Metabolic Activity in Heat-stressed *Listeria monocytogenes* Cells", *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, 77(4), 353.
- 6) M. T. E. Suller and D. Lloyd, "Flow Cytometric Assessment of the Postantibiotic Effect of Methicillin on *Staphylococcus aureus*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42(5), 1195.
- 7) 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.
- 8) N. Yamaguchi, M. Sasada, M. Yamanaka and M. Nasu, "Rapid Detection of Respiring *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice, Milk and Ground Beef by Flow Cytometry", *Cytometry*, 2003, 54A, 27.
- 9) A. Kitaguchi, N. Yamagauchi 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.
- 10) A. Hiraishi and N. Yoshida, "An Improved Redox Dye-Staining Method Using 5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrazolium Chloride for Detection of Metabolically Active Bacteria in Activated Sludge", 2004, 19(1), 61.
- 11) 平石 明, 吉田 奈央子, "活性汚泥における培養不能細菌の検出", 月刊 海洋 培養不能細菌-VNC 研究の現状と課題 -, 2003, 33, 48.
- 12) 染谷 孝, "蛍光染色による土壌微生物の検出法", 月刊 海洋 培養不能細菌-VNC 研究の現状と課題 -, 2003, 33, 14.

最新の情報は web へ  で検索

## 6-3 菌蛍光染色色素

**-Bacstain- CFDA solution**5(6)-Carboxyfluorescein diacetate, solution, DMSO solution  
〔CAS No. 79955-27-4(CFDA:5-isomer)〕同仁品コード：BS03  
100 assays ¥17,400**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」

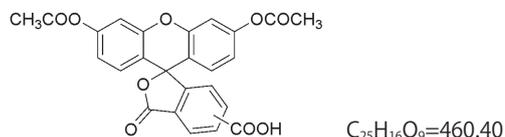
**規格** (1) 性状：無色液体  
(2) 含量：試験適合

**取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等III  
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷蔵，遮光

**危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)**  
感嘆符



構造式



**性質** CFDA は細胞内酵素 (エステラーゼ) 活性を求める色素として、細菌染色において広く用いられている。CFDA は、それ自体では蛍光を持たないが、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 ( $\lambda_{em}=515\text{ nm}$ ) となる。

-Bacstain- CFDA solution は CFDA を DMSO 溶液としているので、試薬調製の手間無く使用できる。

参考文献

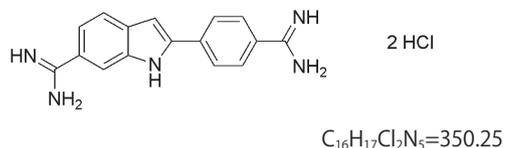
- 1) N. Yamaguchi and M. Nasu, "Flow cytometric analysis of bacterial respiratory enzymatic activity in the natural aquatic environment", *Journal of Appl. Microbiol.*, 1997, 83, 43.
- 2) M. Kawai, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process", *Journal of 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)", *Soil Sci. Plant Nutr.* 2005, 76(4), 401.

最新の情報は web へ  で検索**-Bacstain- DAPI solution**4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, solution  
〔CAS No. 28718-90-3(DAPI)〕同仁品コード：BS04  
100 assays ¥8,400**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」

**規格** (1) 性状：無色～黄色液体  
(2) 含量：試験適合

**取扱注意** 1. 保存方法：冷蔵，遮光

構造式

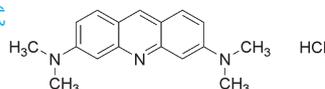


**性質** DAPI は DNA の AT 配列に特異的な minor groove binder である。菌染色において汎用され膜損傷の有・無に関わらず、細胞内へ透過し核酸を染色することができる。-Bacstain- DAPI solution は溶液タイプの DAPI であるため、試薬調製の手間無く使用できる。

\*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、開封前に振り落とすでご使用ください。

最新の情報は web へ  で検索

細胞増殖/毒性  
酸化ストレス  
分子生物学  
細胞内蛍光プローブ  
細胞染色  
細菌研究用試薬  
膜タンパク質  
ラベル化剤  
二価性試薬  
酸化還元  
イオン電極  
シンチレーター  
生化学用緩衝剤  
キレート  
比色/金属試薬  
水質分析用溶媒抽出  
高純度溶媒  
その他  
機能性有機材料

**-Bacstain- AO solution**3,6-Bis(dimethylamino)acridine hydrochloride, solution  
[ CAS No. 65-61-2(AO) ]**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」同仁品コード: BS05  
100 assays ¥8,600**規格** (1) 性状: 黄色~橙色液体  
(2) 含量: 試験適合  
**取扱注意** 1. 保存方法: 冷凍, 遮光**構造式**C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>=301.81**性質** 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いる。AO は dsDNA と結合して緑色の蛍光 (λ<sub>ex</sub>=502 nm, λ<sub>em</sub>=526 nm) を発し、ssDNA や RNA と結合した際は赤色の蛍光 (λ<sub>ex</sub>=460 nm, λ<sub>em</sub>=650 nm) を発する。

-Bacstain- AO solution は溶液タイプの AO であるため、

試薬調製の手間無く使用できる。

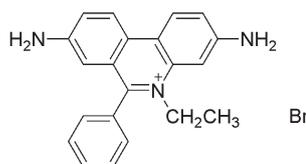
\*本キットには溶液の入ったマイクロチューブのコンポーネントが含まれています。チューブ内壁やキャップに溶液が付着していることがありますので、開封前に振り落としてご使用ください。

**参考文献**

- 1) J. E. Hobbie *et al.*, " Use of Nucleopore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, 33(5), 1225.
- 2) S. F. Nishino, " Direct Acridine Orange Counting of Bacteria Preserved with Acidified Lugol Iodine" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 52(3), 602.

最新の情報は web へ  で検索**-Bacstain- EB solution**

3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide, solution

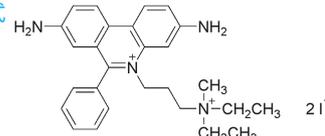
**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」同仁品コード: BS06  
100 assays ¥8,600**規格** (1) 性状: 橙色~赤色液体  
(2) 含量: 試験適合  
**取扱注意** 1. 保存方法: 冷凍, 遮光  
**危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)**  
どくろ 健康有害性**構造式**C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>=394.31**性質** Ethidium bromide (EB) は核酸を染色する蛍光色素です。膜損傷の有・無に関わらず、菌の染色が可能である。EB-DNA 結合体の極大励起波長は 518 nm であり極大蛍光は 605 nm である。

-Bacstain- EB solution は溶液タイプの EB であるため、試薬調製の手間無く使用できる。

\*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ご使用ください。

最新の情報は web へ  で検索**-Bacstain- PI solution**

3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide, solution

**Protocol:** 「細菌を蛍光染色したい」同仁品コード: BS07  
100 assays ¥8,400**規格** (1) 性状: 橙色~赤色液体  
(2) 含量: 試験適合  
**取扱注意** 1. 保存方法: 冷凍, 遮光**構造式**C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>=668.39**性質** Propidium iodide (PI) は Ethidium bromide (EB) の類似体であり、二本鎖の DNA に intercalate して赤い蛍光を発する。

PI は正常な膜をもつ細胞には透過せず、損傷した膜を持つ細胞にのみ透過し核酸を染色する。

このことから、CFDA のような生菌に選択的な蛍光色素

との同時染色に用いられる。

\*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ご使用ください。

最新の情報は web へ  で検索