

# 細菌を蛍光染色したい

## 使用製品

- Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry) [BS01]
- Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy) [BS02]
- Bacstain- CFDA solution [BS03]
- Bacstain- DAPI solution [BS04]
- Bacstain- PI solution [BS07]
- Bacstain- AO solution [BS05]
- Bacstain- EB solution [BS06]

## 解析装置



## I はじめに

細菌や真菌の生存率は寒天培地を用いたコロニー形成能によって評価されるのが一般的である。しかし、この手法は非常に長い時間を要する(24 ~ 72 時間)。また、環境中に存在する微生物のほとんどが未だ最適な培養条件が見出せていないとされる(VNC:viable but non-culturable)。迅速検出法も発展を続けており、PCR 法や LAMP 法等の遺伝試験も汎用される。しかしながら、これらの遺伝子検査では死細胞でも検出されてしまうので、生存率を求める事はできない。

一方で蛍光染色も迅速検出法のひとつであり、生存率測定に応用されている。

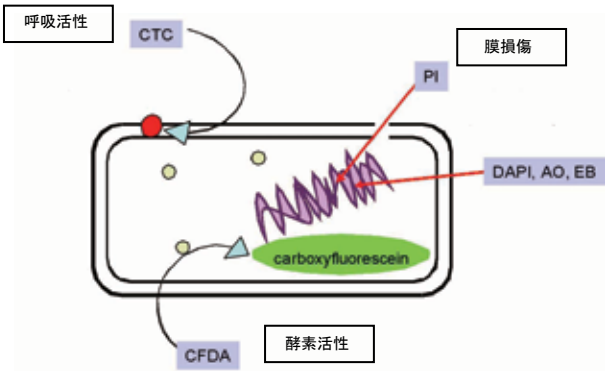


図 1 蛍光染色法による生死判定手法

CTC は細胞の代謝活性に伴い産生される NAD(P)H により還元され、蛍光性のホルマジン色素を生成する。この色素は脂溶性であり、細胞膜表面に沈着したような形で確認できることから、蛍光顕微鏡や Flow cytometer を使った生存率測定に応用されている<sup>1-7)</sup>。CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy, for Flow cytometry) には CTC の還元反応を増強する enhancing reagent が含まれている。これを用いることにより、従来の CTC 染色に比べ高感度なアッセイが可能である。

細胞内エステラーゼ活性の有無により生存率を求めるのに使用されるのが CFDA である。CFDA はそれ自体では蛍光性を持たないが、細胞膜透過後、エステラーゼの加水分解を受ける事により蛍光性の carboxyfluorescein となり B 励起下で緑色の蛍光を発する。また対比染色試薬として核酸染色試薬である DAPI や PI が汎用される<sup>6,7)</sup>。

細胞膜透過性の異なる 2 種の核酸染色試薬を併用した生存率測定法も汎用される。

DAPI は DNA の AT 配列に特異的な minor groove binder であり、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。

PI は細胞膜が損傷した細胞にのみ透過する。よって、DAPI と PI を合わせた二重染色により、細胞膜の損傷を指標とした生死判定に活用される。

## II 細菌の染色例

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry, for Microscopy) (Code: BS01, BS02)

### (1) 操作方法

- 1) CTC の入ったチューブ 1 本に対し、滅菌水 750  $\mu$ l を加えよく混合し、CTC を溶解する<sup>\*</sup>。この時の CTC の終濃度は 50 mmol/l となる。  
<sup>\*</sup> CTC 溶液は -20 $^{\circ}$ C 以下で 2 週間保存可能である。
- 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。(顕微鏡観察: 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> cells/ml, Flow cytometry: 10<sup>6</sup> cells/ml)  
<sup>\*</sup> 染色時に培地成分が残っていると、それにより CTC が還元されることがある。PBS(-) や生理食塩水にしっかりと置換する事が必要である。
- 3) 細胞懸濁液 1 ml に対し、下表に示した量の試薬を加えボルテックスミキサーで混合する。
- 4) 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションし蛍光顕微鏡もしくは Flow cytometer で観察する。

	CTC solution	Enhancing reagent A
Flow cytometry	20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	CTC solution	Enhancing reagent B
Microscopy	20 $\mu$ l	5 $\mu$ l

<sup>\*</sup> CTC による染色効率が良くない場合は染色時間を長くするか CTC 溶液の添加量を増やす。CTC 溶液の添加量を増やす場合は CTC 溶液の添加量を 100  $\mu$ l/sample までとすること。

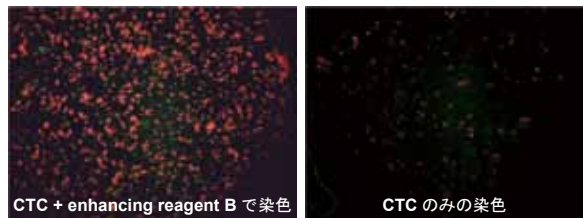
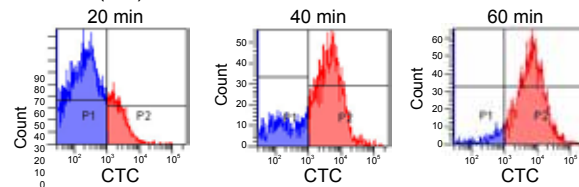


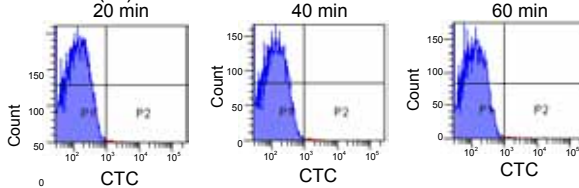
図 2 CTC による細菌の染色例

従来の CTC 染色 (右図) と比べ CTC Rapid Staining Kit による染色 (左図) をしたサルモネラの方が鮮明な赤色蛍光を発している。

### Enhancer (+)



### Enhancer (-)



上段: Enhancing reagent あり 下段: Enhancing reagent なし  
 X 軸: CTC formazan の蛍光強度

図 3 CTC 染色した *Candida albicans* のフローサイトメトリー解析

- 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
- ミトコンドリア関連試薬
- 細菌研究用試薬
- 膜タンパク質可溶化剤
- ラベル化剤
- 二価性試薬
- イオン電極
- その他
- 機能性有機材料

**-Bacstain- CFDA solution** (Code: BS03)

(1) 操作方法

- 1) 凍結した **-Bacstain- CFDA solution** を室温に 30 分間静置し遮光下で融解する。
- 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。(顕微鏡観察 : $10^8 \sim 10^9$  cells/ml, Flow cytometry:  $10^6$  cells/ml)
- 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 $\mu$ l	5 $\mu$ l

- 4) 37°Cにて 5 分間インキュベーションする。  
※ CFDA による染色が十分でない場合は、染色時間を延長すること。
- 5) ホルムアルデヒド (終濃度 1 ~ 4%) を用いて細胞を 10 分程度固定化する。
- 6) 遠心もしくは濾過により上澄みを除去し、新たなバッファーで再懸濁する。
- 7) 蛍光顕微鏡または Flow cytometer で観察する。



図 4 CFDA で染色後、PI にて対比染色を行った *Staphylococcus epidermidis*

※ グラム陽性菌に比べグラム陰性菌は CFDA で染色され難い傾向にある。これは細胞外膜の存在により CFDA が細胞内に透過されにくいためである。このような理由からグラム陰性菌の CFDA 染色には下記に示す染色バッファーが用いられる。

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

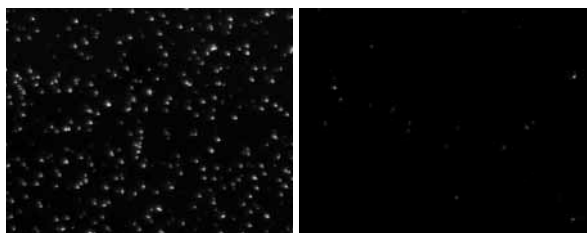


図 5 CFDA 染色時における染色バッファーの比較

写真左は上述した NaCl 及び EDTA を含むリン酸 buffer 中で染色した *E. coli*。右側は PBS(-) 中で同様に染色した *E. coli*。染色効率に明らかな違いが見られる。

**-Bacstain- DAPI solution** (Code: BS04)

(1) 操作方法

- 1) 冷蔵された **-Bacstain- DAPI solution** を室温に 30 分間遮光下で静置する。
- 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。(顕微鏡観察 : $10^8 \sim 10^9$  cells/ml, Flow cytometry:  $10^6$  cells/ml)
- 3) 細胞懸濁液 1 ml に対し DAPI solution 1  $\mu$ l を加えて混合する。
- 4) 室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、必要であればホルムアルデヒド (終濃度 1 ~ 4%) 固定を行う。
- 5) Flow cytometer もしくは蛍光顕微鏡で観察する。  
※ DAPI 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す。

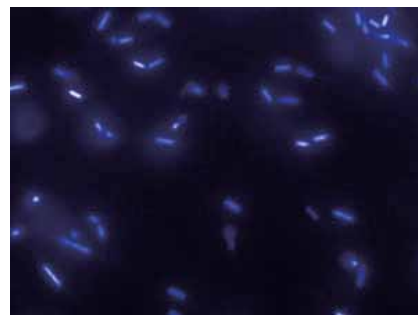


図 6 DAPI 染色を行った *Bacillus cereus*

※ DAPI は CTC や CFDA 染色における対比染色試薬としても使用できる。その場合、CTC または CFDA 染色を行った細胞懸濁液 1 ml に対し DAPI solution 1  $\mu$ l を加え室温にて 5 分間染色する。

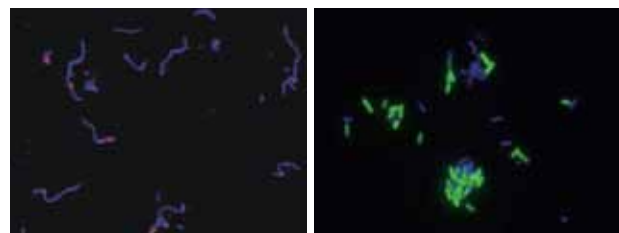


図 7 細菌の二重染色画像

*Lactobacillus casei* を **-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit** (for Microscopy) で染色後、**-Bacstain- DAPI solution** で対比染色した (左図)。*Bacillus cereus* を **-Bacstain- CFDA solution** で染色後、**-Bacstain- DAPI solution** で対比染色した (右図)。

-Bacstain- PI solution (Code: BS07)

-Bacstain- AO solution (Code: BS05)

-Bacstain- EB solution (Code: BS06)

(1) 操作方法

- 1) 冷凍された染色溶液を室温に30分間静置し、遮光下で融解する。
- 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。  
(顕微鏡観察: 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> cells/ml, Flow cytometry: 10<sup>6</sup> cells/ml)
- 3) 細胞懸濁液 1 ml に対し染色溶液 (PI solution 1 μl, AO solution 3 μl, EB solution 10 μl) を加えて混合する。
- 4) 室温にて5分間インキュベーションする。
- 5) Flow cytometer もしくは蛍光顕微鏡で観察する。

※ PI, 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す。

※ PI は膜損傷している細胞のみを染色するため、CFDA や DAPI との併用による生死二重染色試薬として汎用されます。

その場合、CFDA または DAPI 染色を行った細胞懸濁液 1 ml に対し PI solution 1 μl を加え室温にて5分間染色します。

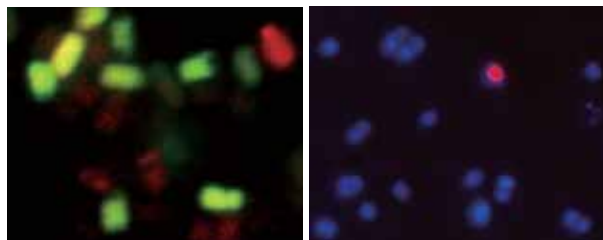


図 8 細菌の二重染色画像

*E. coli* を -Bacstain- CFDA solution で染色後、-Bacstain- PI solution で対比染色した (左図)。

*Staphylococcus epidermidis* を -Bacstain- DAPI solution で染色後、-Bacstain- PI solution で対比染色した (右図)。

### III 各蛍光色素の特徴

表 1 色素の蛍光特性及び性質

色素名	Maximum Ex/Em (nm)	励起 (推奨)	備考
CTC	430, 480/630	B もしくは G 励起	呼吸活性により還元され赤色蛍光色素 (CTC formazan) を生成する。
CFDA	493/515	B 励起	エステラーゼにより加水分解され carboxy-fluorescein (緑色蛍光) を生成する。
DAPI	360/460	UV 励起	膜損傷の有無に関わらず細胞内に透過し、核酸を染色する。
AO	420 ~ 460/630 ~ 650 (ssDNA) 500/520 (dsDNA)	B 励起 (ssDNA) G 励起 (dsDNA)	膜損傷の有無に関わらず細胞内に透過し、核酸を染色する。
EB	520 ~ 525/615	G 励起	膜損傷の有無に関わらず細胞内に透過し、核酸を染色する。
PI	530/620	G 励起	膜損傷を有する細胞内にのみ透過し、核酸を染色する。

### 参考文献

- 1) N. Yamaguchi, M. Sasada, M. Yamanaka and M. Nasu, "Rapid Detection of Respiring Escherichia coli O157:H7 in AppleJuice, Milk, and Ground Beef by Flow Cytometry", *Cytometry*, **2003**, 54A, 27.
- 2) 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.
- 3) A.Hiraishi, N.Yoshida, "An Improved Redox Dye-Staining Method Using 5-Cyano-2,3-Ditoyl Tetrazolium Chloride for Detection of Metabolically Active Bacteria in Activated Sludge", *Microbes Environ.*, **2004**, 19(1), 61.
- 4) 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", 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題-, **2003**, 33, 48.
- 5) 染谷 孝, "蛍光染色による土壌微生物の検出法", 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題-, **2003**, 3, 14.
- 6) N. Yamaguchi and M. Nasu, "Flow cytometric analysis of bacterial respiratory enzymatic activity in the natural aquatic environment", *J. Appl. Microbiol.*, **1997**, 83, 43.
- 7) M. Kawai, N. Yamaguchi, and M. Nasu, "Rapid enumeration of phy-siologically active bacteria in purified water used in the pharma-ceutical manufacturing process", *J. Appl. Microbiol.*, **1999**, 86, 496.
- 8) 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)", *J. Science of Soil and Manure, Japan*, **2005**, 76(4), 401.