

生菌の代謝活性を測定したい

使用製品

Microbial Viability Assay Kit-WST [M439]

解析装置



I 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る。Microbial Viability Assay Kit-WST(Code: M439) 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する。還元発色試薬 WST-8 は電子メディエーターを介し有色のホルマザンへと還元される。吸光度と生成するホルマザン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る。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る。

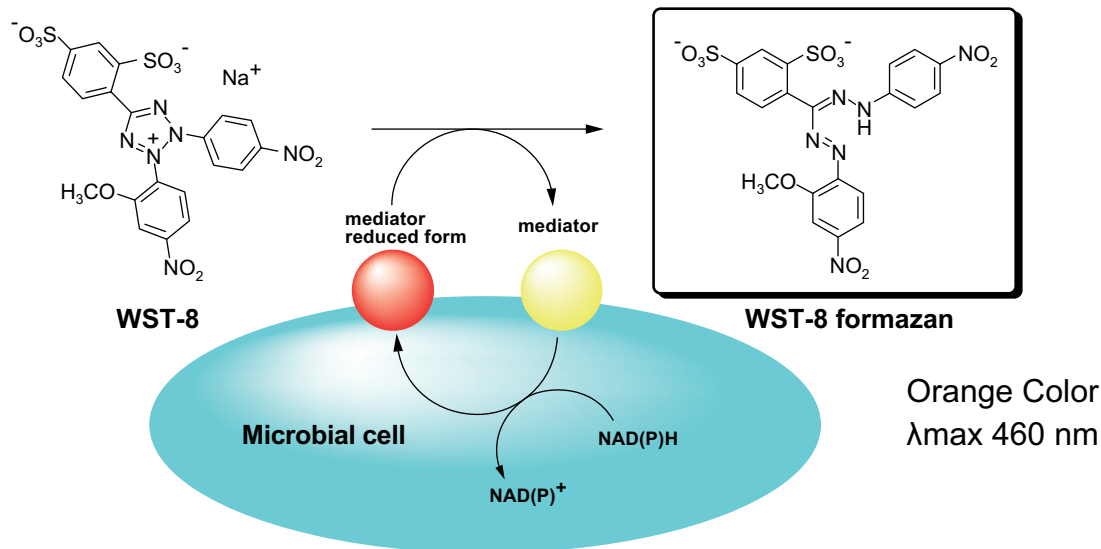


図 1 Microbial Viability Assay Kit-WST による微生物の代謝活性測定原理

II キット内容

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

III 試薬調製並びに実験に必要なもの

(1) 発色試薬調製

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 で保存する。調製後、1 ヶ月は安定です。
- ※ 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ます。グラム陰性菌はそのままの濃度で使用できます。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ありますので、その場合はグラム陽性菌及び真菌用の検出試薬濃度を適用して下さい。
- ※ 96 穴プレートの 1 ウェルあたり 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ます。

(2) キット以外に必要なもの

- 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

IV 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 を接種する。
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る。

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*

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

V 応用例

(1) 薬剤感受性試験

グラム陰性菌

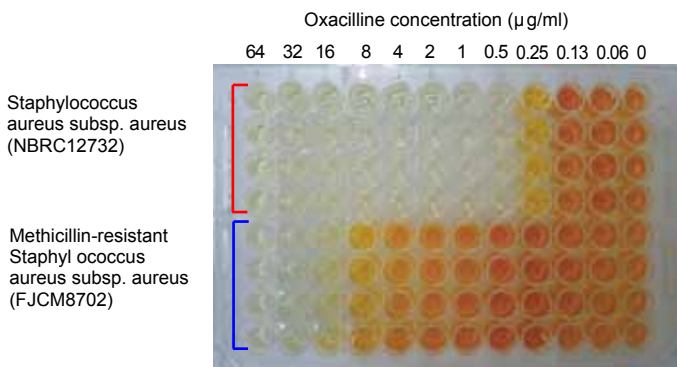
1. 微生物を最適な培地で培養する。
2. 培養した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で O.D._{550nm} が約 0.125 (0.5 McFarland 相当) となるように希釈し、さらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し接種用菌液とする (約 10⁷ CFU/ml)。
3. WST solution と Electron mediator reagent を 9 : 1 の比率で 1.5 ml チューブで混合し、発色試薬を調製する。
(発色試薬は調製後 4℃ 保存する。1 ヶ月間は安定である。)
4. Ca 及び Mg イオン濃度調製済み Mueller-Hinton broth を用いて抗生物質 (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 穴プレートへ抗生物質含有 Mueller-Hinton broth 180 µl/well を分注する。
6. 各ウェルへ接種用菌液 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 倍希釈して使用する。

2) 薬剤感受性試験

黄色ブドウ球菌及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を用い、Oxacillin 添加による薬剤感受性試験を行った。



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)

VI 注意事項

1. 還元剤が存在すると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下さい。
2. 気泡は測定値のバラツキの原因となるので、ご注意下さい。
3. 発色に要する時間は微生物種や代謝活性に依存します。
4. 微生物によっては発色後、退色することがあります。

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, 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.