

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit

L7007 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit *for microscopy*

L7012 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit *for microscopy and quantitative assays*

L13152 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit *10 applicator sets*

ひとこと

受領時の保存条件：

L7007 キットおよび L7012 キット

- -20°C 以下
- 遮光

L13152 キット

- 室温
- 遮光

注：Component C をエマルジョンオイルとして使用しないでください。

はじめに

Molecular Probes 社の LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit は、細菌生存率を測定できる新規の2色蛍光アッセイで、多様な細菌属に有用であることが示されています。従来の細菌生存率の直接計数アッセイは、代謝特性や膜完全性に基づいています。しかし、代謝特性による手法は測定できる細菌群が限定されることが多く¹、細菌膜の完全性を評価する手法はバックグラウンド蛍光強度が高くなる傾向にあります²。いずれのアッセイ法も細菌の増殖や染色の条件に大きく左右されます^{3,4}。細菌属は多岐にわたり、形態、細胞特性、生理的特性が顕著に異なるため、すべての細菌属に適用可能な直接計数生存率アッセイを開発することは非常に困難でした。当社の LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit をご利用になれば、数分で生菌と死菌を容易に、確実に、定量的に識別することが可能です。これは、広範な種類の細菌を含む混合細菌集団にも使用できます。

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit は、当社の SYTO[®] 9 緑色蛍光核酸染色色素および赤色蛍光核酸染色色素である Propidium iodide を用います。これらの色素は、そのスペクトル特性も健全な細菌細胞への透過能も異なります。SYTO 9 色素を単独で用いると、通常ひとつの細菌集団の全細菌を標識し、無傷の膜を持つ細菌と膜が損

傷した細菌とを区別しません。対照的に Propidium iodide は、膜が損傷した細菌にのみ透過し、SYTO 9 と Propidium iodide の両色素が存在する場合に SYTO 9 色素の蛍光を減弱させます。

このため、SYTO 9 色素と Propidium iodide 色素を適切に混合すると、無傷の細胞膜を有する細菌は緑色蛍光で染色され、損傷した膜を有する細胞は赤色蛍光で染色されます。これらの色素の最大励起/発光波長は、SYTO 9 色素では 480/500 nm であり、Propidium iodide 色素では 490/635 nm です。バックグラウンドはほぼ無蛍光のままです。また、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit の推奨色素比は広範な細菌スペクトルで良好に機能することが明らかにされていますが、同キットでは、この色素比を微調整することも可能であり、多様な環境条件下で最適な細菌染色を実現できます。

一般に、細菌生存率の基準として適切な栄養培地における細菌の増殖能が用いられます。LIVE/DEAD BacLight 細菌生存率アッセイでは、通常、細菌が指数増殖している場合に、液体培地または固体培地での増殖率アッセイと良好に相関する結果が得られます。しかし、特定の条件下では、膜が損傷した細菌が回復して増殖できる場合があるものの、本アッセイではそうした細菌が「死菌」と判定されることがあります。また逆に、無傷の膜を有する細菌でも栄養培地中で増殖できないことがあります。これらの細菌が「生菌」と判定される場合もあります⁵。

LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit は、多様な細菌や条件のもとで徹底的に試験を行っています（以下の「試験を実施した細菌」の項を参照）。本キットは蛍光顕微鏡での使用、またはフルオロメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、フローサイトメトリー⁶などの実験装置を用いた定量分析での使用に非常に適しています。最初に発売された LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (L7007) では、色素を異なる割合で混合した2種類の溶液を提供しています。L7007 キットは、この組成を用いたプロトコールを作成済みのお客様向けに、現在でも販売されています。一方、L7012 キットは、SYTO 9 色素と Propidium iodide 色素を別々の溶液として提供していますので、柔軟性が向上しています。染色色素を別々

に提供することにより、定量のための細菌蛍光の較正を容易に実施できます。利便性をさらに高めた LIVE/DEAD BacLight Kit (L13152) では、予め計量した各色素が、一对のポリエチレンホールピペットにそれぞれ注入されています。この L13152 キットは、操作しやすいアプリケーションピペットに充填されているという利便性に加えて、ジメチルスルホキシド (DMSO) が不要であり、また冷凍保存する必要もありません。

LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit は研究用途を想定したツールです。当社のテクニカルサポート部は、本文書に記載のない細菌種および環境条件でのキット性能に関するフィードバックをお待ちしています。

内容

Viability Kit L7007 の内容

- SYTO 9 色素 1.67 mM / Propidium iodide 1.67 mM (Component A)、300 μ L の DMSO 溶液
- SYTO 9 色素 1.67 mM / Propidium iodide 18.3 mM (Component B)、300 μ L の DMSO 溶液
- BacLight 固定用オイル (Component C)、10 mL、メンブレンへの細菌固定用。25°C での屈折率は 1.517 ± 0.003 。エマルジョンオイルに用いないこと。

Viability Kit L7012 の内容

- SYTO 9 色素 3.34 mM (Component A)、300 μ L の DMSO 溶液
- Propidium iodide 20 mM (Component B)、300 μ L の DMSO 溶液
- BacLight 固定用オイル (Component C)、10 mL、メンブレンへの細菌固定用。25°C での屈折率は 1.517 ± 0.003 。浸漬オイルに用いないこと。

L7012 キットの Component A と Component B を 1:1 で混合した溶液は、L7007 キットの Component A と Component B を 1:1 で混合した溶液と完全に同一となります。

Viability Kit L13152 の内容

- SYTO 9 色素 (Component A)、10 本のアプリケーションピペットに安定な固体として封入。
- Propidium iodide (Component B)、10 本のアプリケーションピペットに固体として封入。
- BacLight 固定用オイル (Component C)、10 mL、メンブレンへの細菌固定用。25°C での屈折率は 1.517 ± 0.003 。浸漬オイルに用いないこと。

L13152 キットで提供されるアプリケーションピペットの使用については、以下のプロトコールに記載

のとおり、密封された端を切り取ってから内容物を脱イオン水で溶解します。

測定可能数

推奨される試薬希釈率および容量で測定した場合、L7007 キットおよび L7012 キットは、96 ウェルアッセイ用プレートでは 1,000 回以上、蛍光顕微鏡ではさらにそれ以上、フローサイトメトリーでは約 200 回の測定を行うのに十分な量の試薬が含まれています。L13152 キットは、各アプリケーションのペアに、96 ウェルプレートでは 50 回、蛍光顕微鏡では約 1,000 回、フローサイトメトリーでは 10 回の測定を行うことが可能な量の色素が含まれています。

保存および取り扱い

L7007 および L7012 の両キットは、DMSO ストック溶液を -20°C 以下で遮光して凍結保存します。バイアルを開封する直前に試薬を室温になるまで温め、スピンドウンします。再凍結前に、バイアルはすべてしっかりと密封します。適切に保存した場合、これらのストック溶液は 1 年以上安定です。

L13152 キットは室温で遮光保存します。同キットでは固相の色素が新たに採用され、 37°C で遮光保存した場合、6 ヶ月以上化学的に安定です。溶解した色素溶液は、 -20°C 以下で凍結させ遮光保存した場合 1 年以上安定です。

BacLight 固定用オイルは室温で保存可能であり、無期限に安定です。

注意: Propidium iodide と SYTO 9 色素は核酸に結合します。Propidium iodide は変異原性がありますが、SYTO 9 色素の変異原性または毒性を検討したデータはありません。いずれの試薬も注意して使用してください。DMSO は、有機分子の組織への侵入を促進することが知られているため、そのストック溶液は特に慎重に取り扱う必要があります。DMSO ストック溶液を取り扱う際は、手袋を二重に着用することを強く推奨します。すべての核酸色素と同様、これらの試薬を含有する溶液は、活性炭に通してから廃棄してください。使用した活性炭は必ず焼却して色素を破壊してください。

実験プロトコール、一般的事項

以下のプロトコールでは、研究者が独自の細菌染色手順を作成するときの手引きとなる事例を示しています。Molecular Probes 社の研究者が実際

にこれらの手順でキットを使用し、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の両方で簡単かつ信頼度が高い手順であることを明らかにしています。

培地の条件および細菌懸濁液の調製

注：これらのキットの試薬で細菌を染色する前に、増殖用培地を完全に取り除いてください。核酸およびその他の培地成分が、予測不可能な機序で SYTO 9 および Propidium iodide 色素と結合し、染色に許容できないばらつきが生じる可能性があります。通常は、1 回の洗浄ステップで、染色に影響を及ぼす培地成分の大部分が細菌懸濁液から取り除かれます。洗浄用リン酸緩衝液は、染色効率を低下させると考えられるため推奨されません。

1.1 大腸菌 (*Escherichia coli*) または黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のいずれかの培養液 30 mL を栄養液体培地 (例、DIFCO カタログ番号 0003-01-6) 中で対数増殖期後期まで増殖させます。

1.2 細菌培養液 25 mL を 10,000x g で 10~15 分間遠心分離して濃縮します。

1.3 上清を除去し、ペレットを 0.85% NaCl または適切な緩衝液 2 mL で再懸濁します。

1.4 この懸濁液を、0.85% NaCl または適切な緩衝液 (生細菌用) 20 mL もしくは 70% イソプロピルアルコール (殺処理された細菌用) 20 mL を予め分注した 30~40 mL の遠心管 2 本に 1 mL ずつ添加します。

1.5 両サンプルを、15 分おきに混合しながら、室温で 1 時間インキュベートします。

1.6 両サンプルを 10,000xg で 10~15 分間遠心分離し、ペレットを採取します。

1.7 0.85% NaCl または適切な緩衝液 20 mL でペレットを再懸濁し、ステップ 1.6 と同じ要領で、遠心分離します。

1.8 各試験管のペレットを、0.85% NaCl または適切な緩衝液 10 mL でそれぞれ再懸濁します。

1.9 この細菌懸濁液の 3 mL をガラスまたはアクリル製吸光度キュベット (光路長 1 cm) に分注し、670 nm (OD₆₇₀) で光学濃度を測定します。

1.10 大腸菌または黄色ブドウ球菌の懸濁液の推奨濃度については、お使いの装置に該当する項をご参照ください。この文書では、蛍光顕微鏡、フルオロメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、

フローサイトメトリーの事例を挙げています。

試験を実施した細菌

Molecular Probes 社では、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit を、以下の細菌種について試験しました。*Bacillus cereus*、*B. subtilis*、*Clostridium perfringens*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Micrococcus luteus*、*Mycobacterium phlei*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P. Syringae*、*Salmonella oranienburg*、*Serratia marcescens*、*Shigella sonnei*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pyogenes*。これらのいずれの細菌種においても、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit により得られた結果と、標準的なプレート計数法により得られた結果に高い相関性が認められました。これらの試験は、細菌の対数増殖培養液を用いて行いました。さらに、以下の細菌種で同キットを用いた場合も良好な結果が得られています。*Agrobacterium tumefaciens*、*Edwardsiella ictaluri*、*Eurioplasma eurilytica*、*LactoBacillus* sp.、*Mycoplasma hominus*、*PropioniBacterium* sp.、*Proteus mirabilis*、*Zymomonas* sp.。

染色の最適化

LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit に付属の 2 種類の色素は、1 : 1 で混合すれば大部分のアプリケーションで生菌と死菌を良好に区別できるように調整されています。しかし、識別を最適化するため、この 2 種類の色素の割合を調整しなければならない場合があります。例えば、調製物の緑色蛍光が強すぎる場合、SYTO 9 色素の濃度を低下させる (Component A の使用量を減らす) か、Propidium iodide の濃度を増加させる (Component B の使用量を増やす) ことを推奨します。

染色を十分に最適化するには、広範な濃度の SYTO 9 色素を、広範な濃度の Propidium iodide と組み合わせることを推奨します。L7007 キットと L7012 キットの場合、Component A : Component B を様々な割合で事前混合した色素 3 μ L で、細菌懸濁液 1.0 mL の染色を試すことができます。L13152 キットの場合、Component A ピペット 1 本の内容物を 2.5 mL のフィルター滅菌 dH₂O で溶解し、Component B ピペット 1 本の内容物を 2.5 mL のフィルター滅菌 dH₂O で溶解することで、別々の色素溶液を作製することができます。この溶液を様々な比率で混合して作成した混合物を細菌懸濁液と 1 : 1 の割合で用います。

蛍光顕微鏡のプロトコール

光学フィルターの設定

生菌と死菌から発せられた蛍光は、標準的なフルオレセインロングパスフィルターセットを用いて同時に可視化することができます。また、フルオレセインと Texas Red バンドパスフィルターセットを用いて、生細胞（緑色蛍光）と死細胞（赤色蛍光）を別々に可視化することもできます。LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit に推奨される蛍光顕微鏡フィルターセットは表 1 にまとめられています。

L7007 キットまたは L7012 キットによる懸濁細菌の染色

2.1 Component A と Component B をマイクロチューブに等量入れて、十分混合します。

2.2 この色素混合物を、細菌懸濁液 1 mL につき 3 μ L の割合で添加します。この試薬混合物を推奨希釈倍率で用いる場合、染色液中の DMSO 濃度は 0.3% になります。DMSO 濃度がこれを上回ると、染色に悪い影響を及ぼすことがあります。

2.3 十分に混合し、暗所、室温で 15 分間インキュベートします。

2.4 染色した細菌懸濁液 5 μ L を、スライドと 18 mm 角カバーガラスの間に流し込みます。

2.5 表 1 に記載するフィルターセットのいずれかを備えた蛍光顕微鏡で観察します。

L13152 キットによる懸濁細菌の染色

3.1 Component A ピペット（黄～橙色の固体）1 本と Component B（赤色の固体）1 本の内容物を通常のフィルター滅菌した dH₂O 5 mL で溶解し、LIVE/DEAD BacLight 染色試薬混合物の 2 倍濃度ストック溶液を調製します。

3.2 この 2 倍濃度ストック溶液を等量の細菌懸濁液と混合します。各色素の最終濃度は、SYTO 9 色素が 6 μ M、Propidium iodide が 30 μ M です。

3.3 十分に混合し、暗所、室温で 15 分間インキュベートします。

3.4 染色した細菌懸濁液 5 μ L を、スライドと 18 mm 角カバーガラスの間に流し込みます。

3.5 表 1 に記載するフィルターセットのいずれかを備えた蛍光顕微鏡で観察します。

表 1. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit での使用に適した一般的フィルターの特徴

オメガフィルター*	クロマフィルター*	注
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	SYTO 9 色素および Propidium iodide 色素の同時観察に有用なロングパスおよび 2 重吸収フィルター
XF22, XF23	31001, 41001	SYTO 9 のみ観察用バンドパスフィルター
XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 41004	Propidium iodide のみ観察用バンドパスフィルター

*蛍光顕微鏡用に推奨されるバンドパスフィルターセットのカタログ番号。オメガ®フィルターは Omega Optical Inc. (www.omegafilters.com)、クロマフィルターは Chroma Technology Corp. (www.chroma.com) から販売されています。

蛍光分光測定のプロトコール

L7007 キットまたは L7012 キットによる細菌の染色

4.1 大腸菌の懸濁液（生菌および死菌）を 1×10^8 細菌/mL（約 0.03 OD₆₇₀）または黄色ブドウ球菌の懸濁液（生菌および死菌）を 1×10^7 細菌/mL（約 0.15 OD₆₇₀）になるよう調製します。蛍光分光測定では、一般に、黄色ブドウ球菌の懸濁液の濃度は大腸菌懸濁液の 10 分の 1 になるようにします。

4.2 生菌：死菌の割合が異なる 5 種類の細胞懸濁液を、1 cm のアクリル製、ガラス製、または水晶製蛍光キュベット内でそれぞれ混合します（表 2）。この 5 種類のサンプルの総量はそれぞれ 3 mL になります。

4.3 マイクロ遠心チューブに、Component A 30 μ L と Component B 30 μ L を添加することにより試薬混合液を調製します。

4.4 前述の 5 種類のサンプルそれぞれに、この試薬混合液を 9 μ L ずつ（5 サンプル \times 9 μ L = 総量 45 μ L）添加し、数回ピペッティングして十分に混合します。

4.5 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

L13152 キットによる細菌の染色

5.1 大腸菌の懸濁液（生菌および死菌）を 2×10^8 細菌/mL（約 0.06 OD₆₇₀）または黄色ブドウ球菌の懸濁液（生菌および死菌）を 2×10^7 細菌/mL（約 0.30 OD₆₇₀）になるよう調製します。蛍光分光測定では、一般に、黄色ブドウ球菌の懸濁液の濃度は大腸菌懸濁液の 10 分の 1 になるようにします。

表 2. 蛍光分光測定に用いる生細胞：死細胞の様々な比率と生細胞懸濁液および死細胞懸濁液の混合量

生細胞：死細胞の比	生細胞懸濁液の量 mL	死細胞懸濁液の量 mL
0:100	0	3.0
10:90	0.3	2.7
50:50	1.5	1.5
90:10	2.7	0.3
100:0	3.0	0

5.2 生菌：死菌の割合が異なる 5 種類の細胞懸濁液を、1 cm のアクリル製、ガラス製、または水晶製蛍光キュベット内でそれぞれ混合します（表 2）。L13152 キットを用いる場合、表 2 に記載する細胞懸濁液の半量（1.5 mL）しか使用しないことに留意してください。

5.3 Component A ピペット（黄～橙色の固体）1 本と Component B（赤色の固体）1 本の内容物を通常のフィルター滅菌 dH₂O 5 mL で溶解することにより、LIVE/DEAD BacLight 染色試薬混合物の 2 倍濃度ワーキング溶液を調製します。

5.4 この 2 倍濃度染色用試薬混合物 1.5 mL を等量の細菌懸濁液（1.5 mL）と混合します。前述のとおり、アプリケーションセッティングを 2 個必要とすることに留意してください（5 サンプル \times 1.5 mL = 総量 7.5 mL）。ただし、使用量を少なくすることも可能です。

5.5 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

蛍光分光測定およびデータ解析

6.1 蛍光分光計で各細胞懸濁液（F_{cell}）の蛍光スペクトル（励起は 470 nm、発光は 490～700 nm）を測定します（図 1a）。

6.2 各細菌懸濁液について、510～540 nm の各スペクトル部分（em1、緑色）の積算蛍光強度の、620～650 nm（em2、赤色）の各スペクトル部分の積算蛍光強度に対する比を算出します。

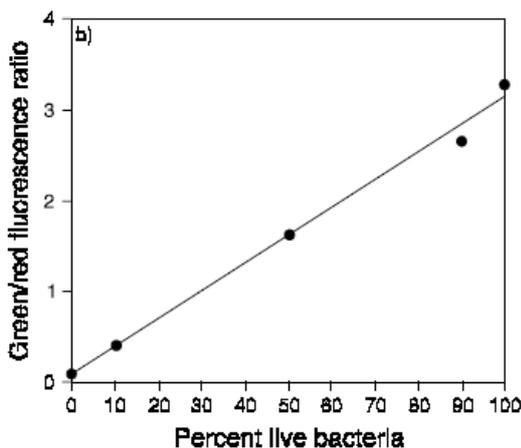
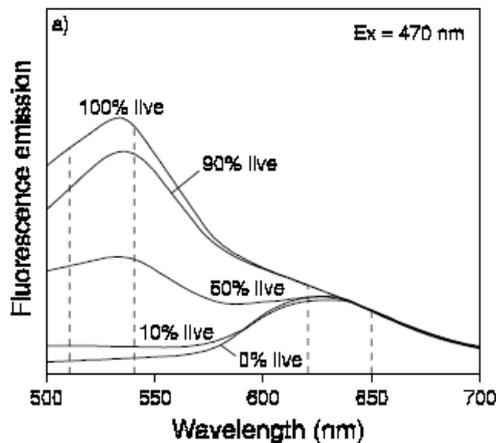


図 1. 蛍光分光測定による大腸菌懸濁液の相対的生存率の解析。a) 本文の概略に従って調製および染色したサンプルから、生存する大腸菌とイソプロピルアルコールで殺処理した大腸菌が様々な割合で存在する懸濁液の蛍光スペクトルが得られました。蛍光発光の積算強度は、垂直の点線にはさまれたスペクトル領域から決定しました。b) 緑色 (510~540 nm) 蛍光と赤色 (620~650 nm) 蛍光の積算強度を取得し、緑色/赤色蛍光比 (Ratio_{G/R}) を、生/死大腸菌の各割合について算出しました。実線は、生菌% (x) と Ratio_{G/R} (y) の関係の最小 2 乗法で示しています。

$$\text{Ratio}_{G/R} = \frac{F_{\text{cell,em1}}}{F_{\text{cell,em2}}}$$

6.3 大腸菌懸濁液中の生細胞の割合に対して、積算赤色蛍光と積算緑色蛍光の比 (R_{G/R}) をプロットします (図 1b)。

蛍光マイクロプレートリーダー

マイクロプレートリーダーにおける蛍光測定に必要な条件は、細菌懸濁液の蛍光分光測定に必要な条件ときわめてよく似ています。蛍光分光測定の実験プロトコールと同様、試薬濃度は蛍光顕微鏡に推奨される濃度と同じであり、緑色蛍光と赤色蛍光の比は、生菌の相対数に比例します。

L7007 キットまたは L7012 キットによる細菌の染色

7.1 大腸菌の懸濁液 (生菌および死菌) を 2×10^8 細菌/mL (約 0.06 OD₆₇₀) または黄色ブドウ球菌の懸濁液 (生菌および死菌) を 2×10^7 細菌/mL (約 0.30 OD₆₇₀) になるよう調製します。蛍光マイクロプレートリーダーでは、一般に、黄色ブドウ球菌の懸濁液の濃度は大腸菌懸濁液の 10 分の 1 になるようにします。

表 3. 蛍光マイクロプレートリーダーに用いる生細胞: 死細胞の様々な比率と生細胞懸濁液および死細胞懸濁液の混合量

生細胞: 死細胞の比	生細胞懸濁液の量 mL	死細胞懸濁液の量 mL
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
50:50	1.0	1.0
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

7.2 生菌: 死菌の割合が異なる 5 種類の大腸菌懸濁液または黄色ブドウ球菌細菌懸濁液を (表 3)、 16×125 mm のハウケイ酸ガラス培養管で混合します。この 5 種類のサンプルの総量はそれぞれ 2 mL になります。

7.3 マイクロ遠心チューブに Component A 6 μ L と Component B 6 μ L を添加します。

7.4 16×125 mm ハウケイ酸ガラス培養管に添加した 2.0 mL のフィルター滅菌 dH₂O に、上記の混合液 12 μ L を全量添加することにより、2 倍濃度染色液を調製し、十分に混合します。

7.5 細菌懸濁液混合物をそれぞれ 100 μ L ずつ、96 ウェル平底マイクロプレートの各ウェルにピペットで分注します。サンプルは 3 反復で調製することを推奨します。外側のウェル (横列 A と H および縦列 1 と 12) は読み取り値が不正確となるため、通常空けておきます。

7.6 ウェルごとに新しいチップを用いて、各ウェルに 2 倍濃度染色液 (ステップ 7.4) を 100 μ L ずつピペットで分注し、数回ピペッティングすることにより十分に混合します。

7.7 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

L13152 キットによる細菌の染色

8.1 大腸菌の懸濁液 (生菌および死菌) を 4×10^8 細菌/mL (約 0.12 OD₆₇₀) または黄色ブドウ球菌の懸濁液 (生菌および死菌) を 4×10^7 細菌/mL (約 0.60 OD₆₇₀) になるよう調製します。蛍光マイク

ロプレートリーダーでは、一般に、黄色ブドウ球菌の懸濁液の濃度は大腸菌懸濁液と比べて 10 分の 1 になるようにします。

8.2 生菌：死菌の割合が異なる 5 種類の大腸菌懸濁液または黄色ブドウ球菌細菌懸濁液を(表 3)、16×125 mm のホウケイ酸ガラス培養管で混合します。

8.3 Component A ピペット (黄～橙色の固体) 1 本と **Component B** (赤色の固体) 1 本の内容物を通常のフィルター滅菌 dH₂O 5 mL で溶解することにより、LIVE/DEAD BacLight 染色試薬混合物の 2 倍濃度ワーキング溶液を調製します。

8.4 細菌懸濁液混合物をそれぞれ 100 μL ずつ、96 ウェル平底マイクロプレートの各ウェルにピペットで分注します。サンプルは 3 反復で調製することを推奨します。外側のウェル (横列 A と H および縦列 1 と 12) は読み取り値が不正確となるため、通常空けておきます。

8.5 ウェルごとに新しいチップを用いて、各ウェルに 2 倍濃度染色液 (ステップ 8.3) を 100 μL ずつピペットで分注し、数回ピペッティングすることにより十分に混合します。

8.6 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

蛍光測定およびデータ解析

9.1 プレート全体の各ウェルについて、約 485 nm を中心とする励起波長で、約 530 nm を中心とする波長 (蛍光 1：緑色) での蛍光強度を測定します。

9.2 プレート全体の各ウェルについて、同じく約 485 nm を中心とする励起波長で、約 630 nm を中心とする波長 (蛍光 2：赤色) での蛍光強度を測定します。

9.3 発光 1 での染色細菌懸濁液の蛍光強度 (F_{cell}) を発光 2 での蛍光強度で除算することによりデータを解析します。

$$\text{Ratio}_{G/R} = \frac{F_{\text{cell},em1}}{F_{\text{cell},em2}}$$

9.4 大腸菌懸濁液中の生細胞の割合に対して Ratio_{G/R} をプロットします (図 2)。

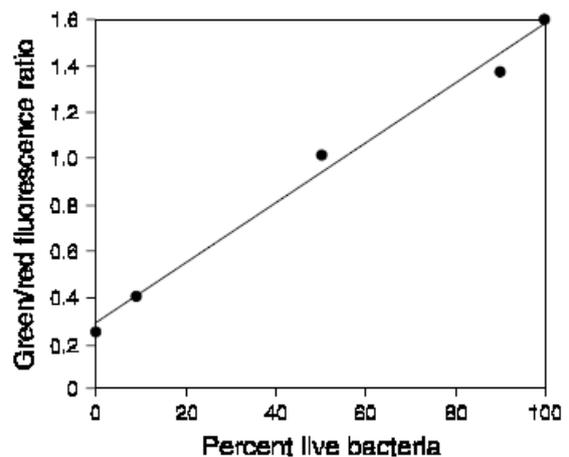


図 2. 蛍光マイクロプレートリーダーでの大腸菌懸濁液の相対生存率の解析。大腸菌のサンプルを本文の概略に従って調製および染色しました。485±10 nm で励起された懸濁液の緑色蛍光 (530±12.5 nm) と赤色蛍光 (620±20 nm) の積算強度を算出し、緑色/赤色蛍光比 (Ratio_{G/R}) を、生/死大腸菌の各割合について算出しました。各点は、10 回の測定の平均値を示しています。実線は、生菌% (x) と Ratio_{G/R} (y) の関係の最小 2 乗法で示しています。

フローサイトメトリー

現在用いられているフローサイトメトリーは、それぞれ性能が大幅に異なることが考えられます。それでも、ここで確立される手法とパラメータは、研究と臨床の両方の現場において同様の解析を行う場合に大半のフローサイトメトリーに十分に役立つと考えられます。

表 4. フローサイトメトリーに用いる生細胞：死細胞の様々な比率と生細胞懸濁液および死細胞懸濁液の混合量

生細胞：死細胞の比	生細胞懸濁液の量 mL	死細胞懸濁液の量 mL
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
20:80	0.4	1.6
30:70	0.6	1.4
40:60	0.8	1.2
50:50	1.0	1.0
60:40	1.2	0.8
70:30	1.4	0.6
80:20	1.6	0.4
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

L7007 キットまたは L7012 キットによる細菌の染色

10.1 大腸菌の懸濁液（生菌および死菌）を 1×10^8 細菌/mL（約 0.03 OD₆₇₀）になるよう調製し、これをフィルター滅菌 dH₂O で 1 : 100 の割合で希釈して、最終密度が 1×10^6 細菌/mL になるようにします。

10.2 表 4 に従って、生菌 : 死菌の割合が異なる 11 種類の細菌懸濁液を、16×25 mm のホウケイ酸ガラス管で混合します。この 11 種類のサンプルの総量はそれぞれ 2 mL になります。

10.3 マイクロ遠心チューブで、Component A 35 μ L と Component B 35 μ L を混合します。L7012 キットを用いる場合、さらに Component A のみ、および Component B のみで染色する細菌サンプルを調製することを推奨します。

10.4 前述の 11 種類のサンプルそれぞれに、この試薬混合液を 6 μ L ずつ（11 サンプル×6 μ L=66 μ L）添加し、数回ピペッティングすることにより十分に混合します。

10.5 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

L13152 キットによる細菌の染色

11.1 大腸菌の懸濁液（生菌および死菌）を 1×10^8 細菌/mL（約 0.03 OD₆₇₀）になるよう調製し、これをフィルター滅菌 dH₂O で 1 : 50 の割合で希釈して、最終密度が 2×10^6 細菌/mL になるようにします。

11.2 表 4 に従って、生菌 : 死菌の割合が異なる 11 種類の細菌懸濁液を、16×25 mm のホウケイ酸ガラス管で混合します。L13152 キットを用いる場合、表 3 に記載する細胞懸濁液の半量（1.0 mL）しか使用しないことに留意してください。

11.3 Component A ピペット（黄色～橙色の固体）1 本と Component B ピペット（赤色の固体）1 本の内容物を通常のフィルター滅菌 dH₂O 5 mL で溶解することにより、LIVE/DEAD BacLight 染色試薬を混合した 2 倍濃度使用溶液を調製します。さらに Component A のみ（フィルター滅菌 dH₂O 5 mL に溶解）および Component B のみ（フィルター滅菌 dH₂O 5 mL に溶解）で染色する細菌サンプルを調製することを推奨します。

11.4 この 2 倍濃度使用溶液 1 mL を等量の細菌懸濁液（1 mL）と混合します。前述のとおり、アプリケーションセットを 3 個必要とすることに留意してください（11 サンプル×1 mL=総量 11 mL）。ただし、使用量を少なくすることも可能です。

11.5 暗室、室温で 15 分間インキュベートします。

装置のパラメータ

この事例に示すデータは、488 nm および 400 mW 出力のアルゴンイオンレーザー搭載 Coulter EPICS V™ フローサイトメトリーを用いて取得しました。データ取得および解析は、Cytomation CICERO ソフトウェアおよびハードウェアインターフェースを用いて制御しました。発光経路は、515 nm ブロッキングフィルター、590 nm 2 色性フィルター（Green PMT [光電子増倍管] の前）、610 nm 吸収フィルター（Red PMT の前）で構成しました。大腸菌懸濁液の密度は 1×10^6 細胞/mL であり、サンプリング速度は約 300 粒子/sec としました。シース液は蒸留水であり、フローチップは 76 μ m のエアータップとしました。

蛍光測定およびデータ解析

生細胞も死細胞も緑色蛍光を発するため、シグナル分別器の対数積分緑色蛍光（LIGFL）を 15% に設定して、デブリを除去しました。細菌集団は対数積分赤色蛍光（LIRFL）対 LIGFL プロット（図 3a）の 3 つの領域に区分され、これらの領域内に認められる細菌数を用いて、集団中の生菌の割合を推定しました（図 3b）。

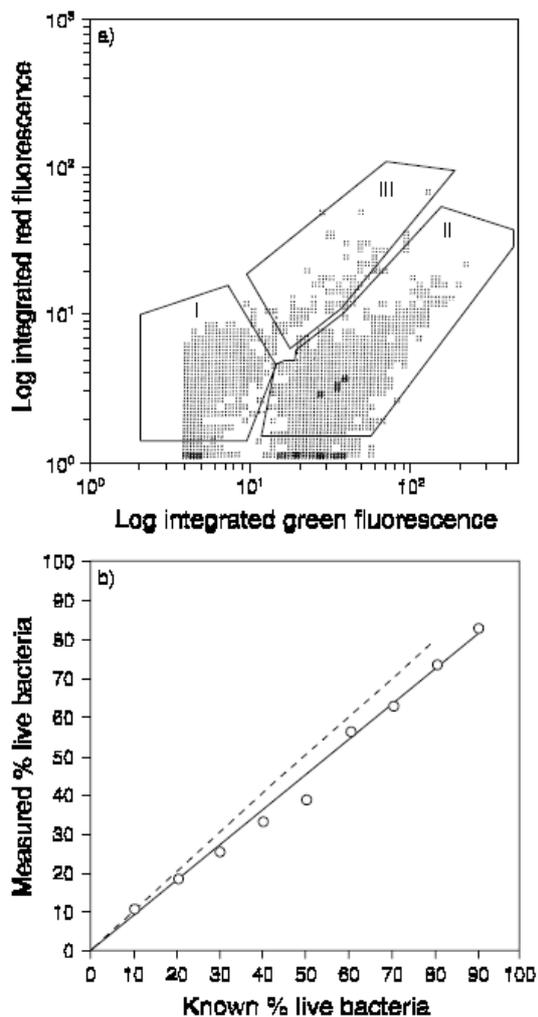


図 3. フローサイトメトリーによる大腸菌懸濁液の相対生存率の解析。本文の概略に従って、大腸菌サンプルを調製、染色、解析しました。a) 「殺処理された」菌が70%を占める集団から得られた個々の細菌の蛍光発光の緑色成分および赤色成分を2パラメータ比較した結果、2つの大領域 (I および II) と1つの小領域 (III) が示されています。細菌の大部分は領域 I (死細胞) と領域 II (生細胞) に示されており、その赤色蛍光強度は同等で緑色蛍光の割合は異なっています。領域 III の大腸菌は総じて集団の5%未満であり、その生死の特徴については解明されていません。b) 既知の生存率は、「生菌」または「死菌」の割合として定義されます。測定される生存率は、以下の式により定義されます。測定された生菌率 = (領域 II の細菌数 / 領域 I + II の細菌数) × 100。100% 「生菌」の点に外挿する最小2乗法により、「生菌」集団に死菌が13%存在することが示唆されました。上側の線 (点線) は、「生菌」懸濁液中の死菌13%を補正したものです。

参考文献

1. J Appl Bacteriol 72, 410 (1992);
2. Lett Appl Microbiol 13, 58 (1991);
3. Curr Microbiol 4, 321 (1980);
4. J Microbiol Methods 13, 87 (1991);
5. Microbiol Rev 51, 365 (1987);
6. J Med Microbiol 39, 147 (1993).

製品リスト 現在の価格は、ホームページでご確認いただくか、カスタマーサービス部にご連絡ください。

カタログ番号	製品名	単位
L7007	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit *for microscopy* *1000 assays*	1 kit
L7012	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit *for microscopy and quantitative assays* *1000 assays* ..	1 kit
L13152	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit *10 applicator sets*	1 kit

Contact Information

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Leiden, the Netherlands. All others should contact our Technical Assistance Department in Eugene, Oregon.

Please visit our Web site . www.probes.com . for the most up-to-date information

Molecular Probes, Inc.

29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402
Phone: (541) 465-8300 • Fax: (541) 335-0504

Customer Service: 6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)

Phone: (541) 335-0338 • Fax: (541) 335-0305
order@probes.com

Toll-Free Ordering for USA and Canada:

Order Phone: (800) 438-2209 • Order Fax: (800) 438-0228

Technical Assistance: 8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)

Phone: (541) 335-0353 • Toll-Free: (800) 438-2209
Fax: (541) 335-0238 • tech@probes.com

Molecular Probes Europe BV

Poortgebouw, Rijnsburgerweg 10
2333 AA Leiden, The Netherlands
Phone: +31-71-5233378 • Fax: +31-71-5233419

Customer Service: 9:00 to 16:30 (Central European Time)

Phone: +31-71-5236850 • Fax: +31-71-5233419
eurorder@probes.nl

Technical Assistance: 9:00 to 16:30 (Central European Time)

Phone: +31-71-5233431 • Fax: +31-71-5241883
eurotech@probes.nl

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. Our products are not available for resale or other commercial uses without a specific agreement from Molecular Probes, Inc. We welcome inquiries about licensing the use of our dyes, trademarks or technologies. Please submit inquiries by e-mail to busdev@probes.com. All names containing the designation [®] are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2004, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.