

紫外可視分光光度計を用いた細菌の光学密度測定における分光器光学系による違い

Brian C. Matlock, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE USA

キーワード

細菌増殖、大腸菌、光学密度 (OD)、OD600、紫外可視分光光度計

背景

細菌培養液の光学密度 (OD) 測定は、微生物学において使用される一般的な手法です。研究者らは、これらの測定を行うために紫外可視分光光度計を使用してきましたが、この測定は、実際にはサンプル (培養液) に吸収された光の量ではなく、培養液によって散乱された光の量に基づきます。標準構成の分光光度計は、光散乱測定用に最適化されておらず、通常、測定された測定値 (吸光度) には、機器間で差が生じることがあります。

はじめに

培地中の細菌増殖の標準段階 (誘導期、対数期、静止期、および死滅期) はよく知られており、対数期は細菌が可能な限り急速に分裂するフェーズとして認識されています¹。通常、細菌増殖をモニターするために、分光光度計を使用して、600 nm (OD600) で光学密度を測定します。細菌の測定において OD600 が使用される一般的なアプリケーションとして次の三つが挙げられます：

- 細菌タンパク質発現プロトコルにおいて、培養を誘導するための最適時間の決定と標準化
- 最小発育阻止濃度 (MIC) 実験のための接種菌濃度の決定と標準化
- コンピテントセルを採取し調製する最適時間の決定

研究者および製造施設は、これらの OD 測定を行うために、分光光度計を使用しています。

しかし、比色法で理解されているように、光学密度は吸光度の測定値ではありません。細菌懸濁液からの散乱によって引き起こされる透過率の低下を測定した値です。分光光度計は、比色分析の場合と同様に、この減衰された透過率を吸光度に変換します。

分光光度計の光学配置 (構成) が光学密度測定に及ぼす影響は既に報告されています²⁻⁴。異なる光学配置 (光学モジュール構成) を有する機器を用いれば、同じ細菌懸濁液についてでも異なる光学密度が測定されます。つまり、分光光度計の光学配置の違いが、観測される値に影響を与えます。

前分光光学系は、吸光度の測定に単色光を使用し、後分光光学系は、試料を通過した後に個々の波長に識別される多色光を利用します。前分光光学系のいくつかの構成要素は、測定された OD 値の差に影響を及ぼします：

- サンプルと検出器の間の距離
- 使用する集光レンズのサイズおよび焦点距離
- 検出器の面積および感度⁵

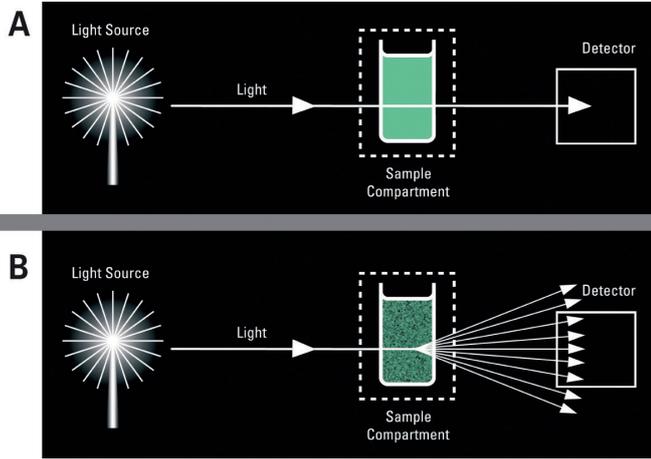


図1. 分光光度法における光散乱

- A. 散乱のない試料では、光源と検出器との間の光透過における減衰は、試料による光の光化学的吸収によって引き起こされます
- B. 散乱試料（細菌懸濁液）において、検出器に到達する光は、懸濁液中の細胞の光の散乱によってさらに減少します。検出器に到達する光のこのような減少により、あたかも試料の光吸収が増加したように見えます

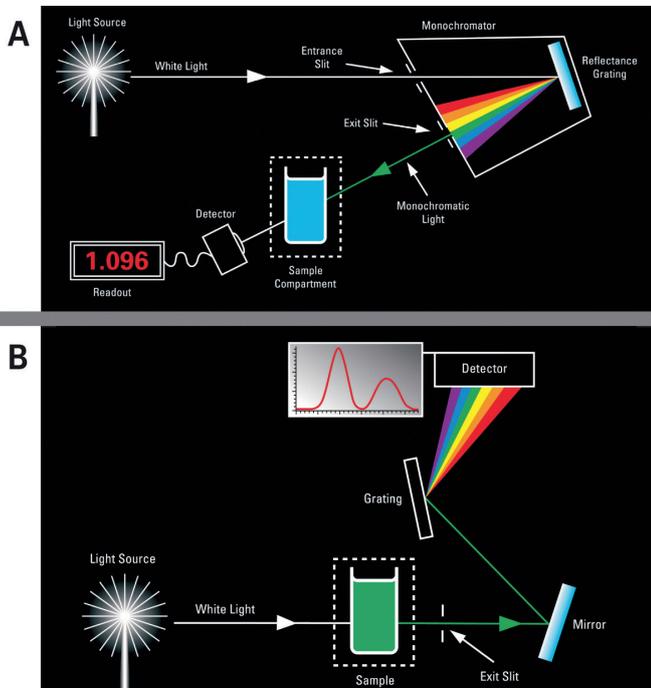


図2. 前分光光学系と後分光光学系の違い

- A. 前分光光学系では、モノクロメーターで分光された単色光は試料を通過してから検出器に到達します
- B. 後分光光学系では、多色光が試料を通過した後、グレーティングで個々の波長に分光され、アレイ検出器上で測定されます

異なる光学配置が異なるOD値を与えるという現在の知見にもかかわらず、研究者らは、異なる分光光度計の間で見られるOD値の差についての懸念事項を提起し続けています。

材料および方法

菌株

E. coli JM-109-*end A1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), recA1, supE44, (lac-pro AB), [F' tra D36, pro AB, laq I^qZ M15]* (Promega, L2001)

分光光度計

Thermo Scientific™ 紫外可視分光光度計 (表1)

増殖曲線

E. coli JM109を一晩培養した培養液から50 mLを、250 mL バッフルフラスコでLuria Bertani (LB) 培地を用いて培養しました (16時間、250 rpm、37°C)。この培養液のうち12 mLを、2 L バッフルフラスコ中のあらかじめ加温した (37°C) LB培地 600 mLに移すことによって調製し、合計9.5時間培養したものをバッチ培養物としました。

培養試料採取

すべての分光光度計において、LB培地を用いてブランク測定を行いました。30分ごとに、バッチ培養物から5 mLの単位試料 (アリコート) をサンプリングしました。未希釈培養物の3 mL単位試料を10 mmキュベットに移し、600 nmでの光学密度を、表1のすべての分光器で測定しました。

二つ目の10 mmキュベットには、LB培地でOD600が約0.5になるように希釈されたバッチ培養物の単位試料を移しました。この二番目のOD測定は、培養物の光学密度が分光光度計の測光OD範囲内であることを確認する目的で行われました。

生菌数

各30分間隔で、サンプル単位試料を使用して段階希釈を行いました。希釈物をLB寒天培地上にプレーティングし、37°Cで一晩インキュベートしました。コロニーを計数して、各時点での細菌細胞数 (CFU/mL) を測定しました。

マクファーランド標準液

四つのマクファーランド標準液 (Thermo Scientific™ Remel™, R20421, No.1.0~4.0) のOD600測定を、1 cm光路長キュベットを使用して各機器で行いました。

表1. Thermo Scientific分光光度計

機器	光学系	光学配置	光源	検出器
Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000c	後分光		キセノンフラッシュランプ	CMOSアレイ
Thermo Scientific™ SPECTRONIC™ 200	後分光		タングステンランプ	CMOSアレイ
Thermo Scientific™ BioMate™ 160	前分光	デュアルビーム	キセノンフラッシュランプ	シリコンフォトダイオード
Thermo Scientific™ Evolution™ 260 Bio	前分光	ダブルビーム	キセノンフラッシュランプ	シリコンフォトダイオード
Thermo Scientific™ Evolution™ 350	前分光	ダブルビーム	キセノンフラッシュランプ	シリコンフォトダイオード

結果

未希釈試料および希釈培養試料のOD600測定データが得られました。代表的な増殖曲線を図3に示します。希釈試料のOD600値に希釈係数を乗じ、未希釈サンプルと比較しました。二つのプロットの発散は、異なる光学構成が、光学密度測定に関して異なるダイナミックレンジを有することを示しています。

各分光光度計の補正OD値と細胞数を比較したところ、同様の光学系を有する機器は、経時的に同様のOD曲線を生成することがわかりました(図4)。前分光光学系かつデュアルビーム光学配置を持つBioMate 160分光光度計のOD600の測定値は、プレート計数法で示されたものよりも系統的に低くなっています。これはおそらく、独特の光学的構成によるものです。マクファーランドのデータは、大腸菌増殖曲線でご覧されたものと同様の傾向を示し、光学系によらずおおむね同様の結果が得られました(図5)。

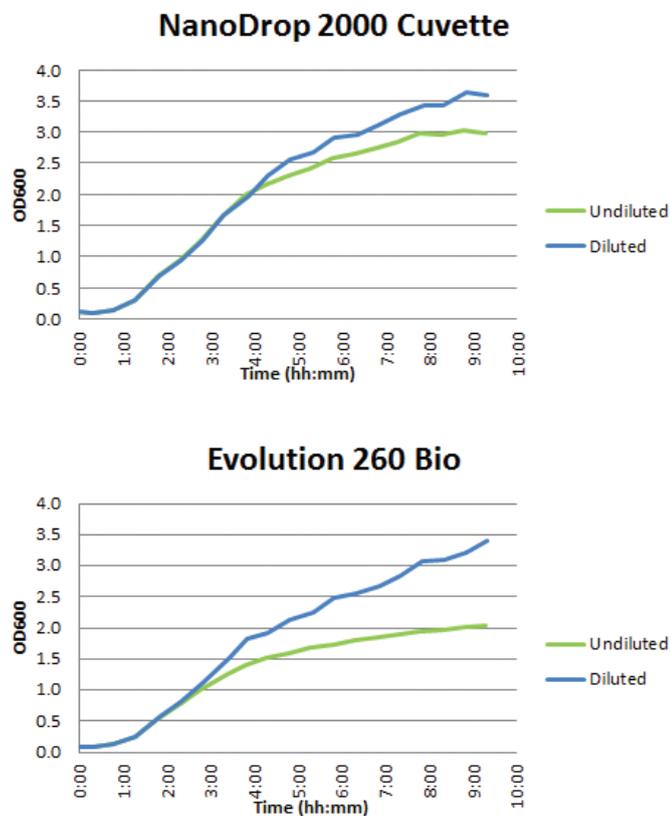


図3. 希釈または未希釈の細菌試料のOD600を測定することによって定義される大腸菌JM109の増殖曲線の比較。OD600測定は、NanoDrop 2000とEvolution 260 Bioで行いました。OD測定は30分ごとに9.5時間行いました。青い線は、希釈培養サンプルのOD600を表します。試料は光学系のダイナミックレンジ内になるように希釈しました。緑色の線は、未希釈の培養サンプルのOD600を表します。

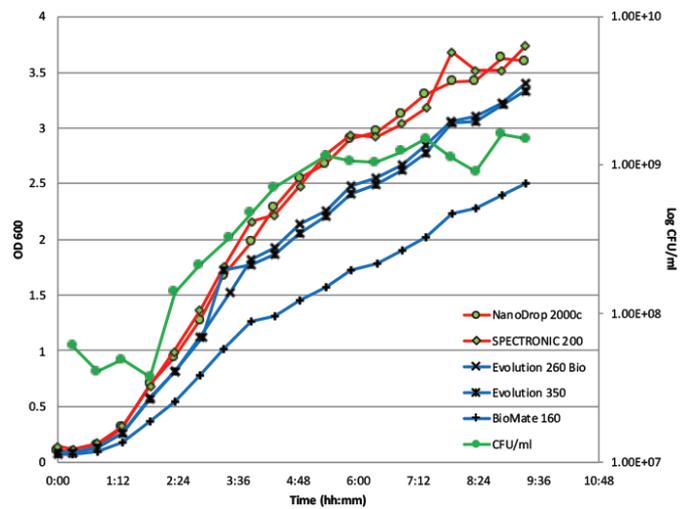


図4. 補正OD値から得られた大腸菌JM109の増殖曲線。OD600は、30分ごとに9.5時間、すべての機器で測定しました。OD600データは、OD測定に使用した希釈係数で補正しました。試料は光学系の測光範囲内になるように希釈しました。次いで、各分光光度計についての補正ODを、生細胞数データと一緒にプロットしました。

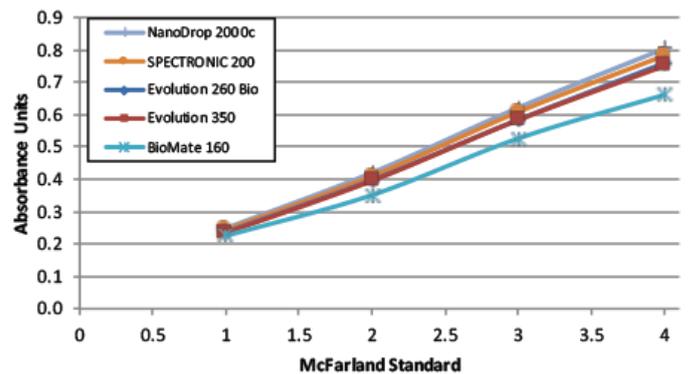


図5. 表1の分光光度計で測定したさまざまなマクファーランド標準液のOD600

分光光度計間の変換

二つの機器間で観察される光学密度の変動により、プロトコルの標準化が困難になる可能性があります。これは、ある研究室が別の実験室からのデータを複製しようとする場合や、同じラボで古い分光光度計を新しいものに更新する場合などに起こります。



図6は、Evolution 260 Bio分光光度計およびSPECTRONIC 200分光光度計の両方で測定された培養物のODを示します。二つの機器間のOD比を各時点で計算しました。これらの比の平均を計算し、乗算係数として使用しました。Evolution 260 Bio分光光度計については、計算された変換係数1.22を用いました。この変換係数をODデータに適用すると、データが正規化され、両方の機器間の比較が可能となります。

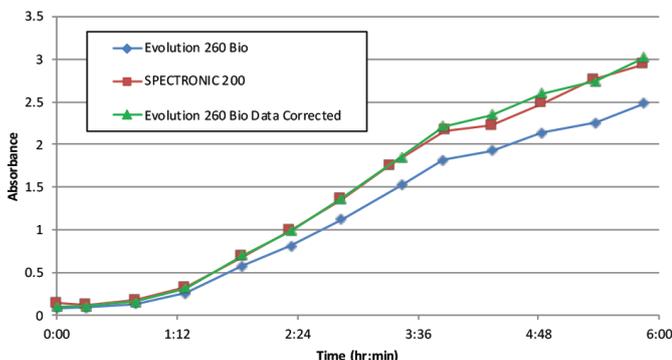


図6. 変換係数を適用して、二つの異なる分光光度計のOD600データを比較します。青= Evolution 260 Bioのオリジナルデータ；緑=Evolution 260 Bioデータ×係数1.22

$$\frac{\text{従来の分光光度計の測定値}}{\text{新しい分光光度計の測定値}} = \text{変換係数}$$

図7. 分光光度計間の変換係数の式計算

もっとも正確な変換係数を出すためには、二つのことが重要です：

- これらの値を計算するために使用されるすべてのOD測定値は、補正されたODデータからのものであること (図3)
- OD測定の対数範囲にわたって計算される複数の変換係数の平均を取ること

詳しい情報は、thermofisher.com/uv-vis をご覧ください。

© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
 実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
 標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **UV035-A2103OB**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

結論

OD測定値を計算する場合、分光光度計の光密度性能とダイナミックレンジを確認することが重要です。OD読み取り値が装置のダイナミックレンジから外れる場合は、細胞懸濁液を希釈します。

OD測定は光学系と光学配置に大きく依存します。異なる光学系および構成を有する分光光度計は、同じ懸濁液について異なるOD値を示します。たとえば、NanoDrop 2000c分光光度計の後分光光学系と、前分光光学系かつデュアルビームのBioMate 160分光光度計での測定値には相違があります。

最後に、分光光度計間で適切な比較を行うために、ODデータの正規化に使用できる変換係数を計算する方法を提示します (図7)。粒子のサイズと形状が変換係数に影響を与えるため、変換係数は、特定のサンプルに固有のものであることに留意することが重要です。

参考文献

1. Daniel R. Caldwell, Microbial Physiology and Metabolism (Wm. C. Brown Publishers, 1995), 55-59
2. Arthur L. Koch, "Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments," Analytical Biochemistry 38 (1970): 252-59
3. Arthur L. Koch, "Theory of the Angular Dependence of Light Scattered by Bacteria and Similar-sized Biological Objects," Journal of Theoretical Biology 18 (1968): 133-56
4. J.V. Lawrence and S. Maier, "Correction for the Inherent Error in Optical Density Readings," Applied and Environmental Microbiology Feb. (1977): 482-84
5. Gordon Bain, "Measuring Turbid Samples and Turbidity with UV-Visible Spectrophotometers," Thermo Scientific Technical Note 51811