

Ⅲ 蛍光顕微鏡による細胞観察および計数

1. 全菌数の測定「DAPIとAcridine Orange」

(1) 材料

1) 材料

材料名	数量(容量)	備考
フィルター濾過セット	1	径 25mm
イソポアフィルター	3以上/検体	径 25mm、0.22 μ m
カートリッジメンブレンフィルター	1/検体	0.22mm
プラスチックシリンジ	1	
スライドガラス	2以上/検体	
カバーガラス	2以上/検体	
ガスバーナー	1	
ピンセット	1	
1.5ml サンプルチューブ	2以上/検体	オートクレイブ処理。 全菌および生菌数測定用。
チップ 0.1-10ml		オートクレイブ処理。

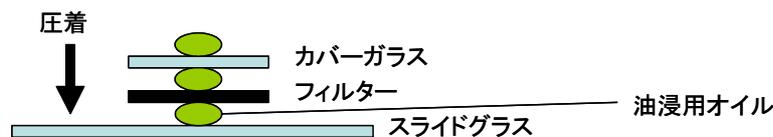
2) 試薬

材料名	数量(容量)	備考
アクリジンオレンジ		①ストック溶液(1%) ②使用時 ストック液 5ml + D.W.95ml を 100ml ポリビンに遮光保存 (保管時は冷蔵) もしくは 0.01M Tris-HCl buffer(pH7.4)に 0.01%の濃度に調製。 用時調製が望ましい。
DAPI		0.01M Tris-HCl buffer(pH7.4)に 1 μ g/ml の濃度に調製。 長期保存できるので、ストック(10-100 μ g/ml)を小分けして冷凍保存するとよい。 東濃は 50 μ g/ml DW 溶液使用
0.01M Tris-HCl buffer(pH7.4)		0.2M Tris 25ml に 0.2M HCl を 20.7ml 加え、蒸留水で 500ml としたものを。
70%アルコール		
油浸オイル(IMMERSION OIL)		

注意) 器具はすべて酸洗浄(1~0.1N)

(2) 操作

- 1) 試料(ホルマリン固定したもの:終濃度 4%)を用意する。
- 2) バーナーで濾過器具等を滅菌する。
- 3) フィルター $0.22\ \mu\text{m}$ を濾過器にセットする。
- 4) 試料を滅菌チップ(ピペットマン)で適量(通常 0.5-1.0ml)を濾過器に移し、軽く混ぜて、吸引濾過する。
- 5) エア抜き
- 6) ファンネルの内側をフィルター滅菌水(シリンジ+滅菌フィルター)で軽く洗い、濾過する。
- 7-1) アクリジンオレンジ 2-3 滴加え、3min 反応させる。
- 7-2) DAPI をフィルターが浸る程度(0.5-1.0ml)加え、5min 反応させる。
- 8) 濾過
 - 注) アクリジンオレンジは乾燥させてはいけない
wet: 緑色、dry: オレンジ色、(バックグラウンドがオレンジ色なので判別不能になる)
- 9) 下記のようなプレパラートを作成する。
ピンセット等でプレパラートをしっかりと密着させる。



10) 蛍光顕微鏡で観察

- ① 1試料について、フィルター3枚を調製し、各 100 視野計測し、平均値を算出する。
- ② バックグラウンドとしてフィルターのみ(ネガコン)を計測する。

11) 繰り返す場合

- ① スライドガラス: アルコールで洗浄
- ② ファンネル: バーナー滅菌

2. 全菌数の測定「SYBR Green I」

(1) 材料

1) 材料

	材料名	数量(容量)	備考
	フィルター濾過セット	1	径 25mm
	イソポアフィルター	3以上/検体	径 25mm、0.22 μ m
	カートリッジメンブレンフィルター	1/検体	0.22mm
	プラスチックシリンジ	1	
	スライドガラス	2以上/検体	
	カバーガラス	2以上/検体	
	ガスバーナー	1	
	ピンセット	1	
	1.5ml サンプルチューブ	2以上/検体	オートクレイブ処理。 全菌および生菌数測定用。
	チップ 0.1-10ml		オートクレイブ処理。

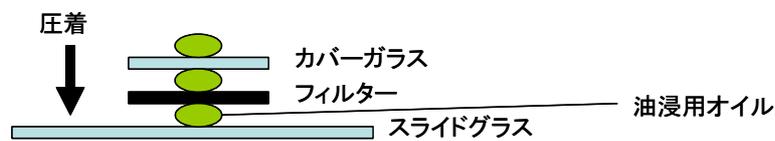
2) 試薬

	材料名	数量(容量)	備考
	SYBR Green I		モルキュラープローブ社の場合は、5 μ g/ml D.W. 凍結保存(凍結融解 OK)
	70%アルコール		
	油浸オイル(IMMERSION OIL)		

注意) 器具はすべて酸洗浄(1~0.1N)

(2) 操作

- 1) 試料(ホルマリン固定したもの:終濃度 4%)を用意する。
- 2) 1.5ml 滅菌チューブに試料を 1ml とサイバーグリーン100 μ l を加える。
- 3) 15分間反応(暗所にて)
- 4) バーナーで濾過器具等を滅菌する。
- 5) フィルター0.22 μ m を濾過器にセットする。
- 6) 反応液を濾過
- 7) 下記のようなプレパラートを作成する。
ピンセット等でプレパラートをしっかりと密着させる。



- 8) 蛍光顕微鏡で観察
 - ① 1試料について、フィルター3枚を調製し、各 100 視野計測し、平均値を算出する。
 - ② バックグラウンドとしてフィルターのみ(ネガコン)を計測する。
- 9) 繰り返す場合
 - ① スライドガラス: アルコールで洗淨
 - ② ファンネル: バーナー滅菌

3. 生菌数の測定 (Live/Dead BacLight Viability Kit)

(1) 材料

1) 材料

材料名	数量(容量)	備考
フィルター濾過セット	1	径 25mm
イソポアフィルター	3以上/検体	径 25mm、0.22 μ m
カートリッジメンブレンフィルター	1/検体	0.22mm
プラスチック滅菌シリンジ	1	1ml
スライドガラス	2以上/検体	
カバーガラス	2以上/検体	
ガスバーナー	1	
ピンセット	1	
1.5ml サンプルチューブ	2以上/検体	オートクレイブ処理。 全菌および生菌数測定用。
チップ 0.1-10ml		オートクレイブ処理。

2) 試薬

材料名	数量(容量)	備考
Live/Dead BacLight Viability Kit *		
70%アルコール		
油浸オイル(IMMERSION OIL)		

注意) 器具はすべて酸洗浄(1~0.1N)

* Live/Dead BacLight Viability Kit の試薬調製法

① Kit L-13152 の場合

- 2X ストック液の調製: A pipet(オレンジ)と B pipet(レッド)を 5ml フィルター滅菌水に溶解
- ストック液と等量の試料液を混合する。
- 室温暗所で 15min 反応
- 5 μ l を顕微鏡観察

② Kit L-7007 or Kit 7012 の場合

- 試薬 A と試薬 B を等量混合する。
- 上記混液 3 μ l を試料液 1ml と混合する。
- 室温暗所で 15min 反応
- 5 μ l を顕微鏡観察

(2) 操作

1) 試料を用意する。

- ① 試料はバイアルビンにシールして入っているのが望ましい。
- ② 試料滅菌シリンジでバイアルビンから取り出す(N₂ガスで置換するのが望ましい)。

2) 1.5ml チューブに試料 1ml と試薬 150 μ l を加える。

3) 15min 反応させる

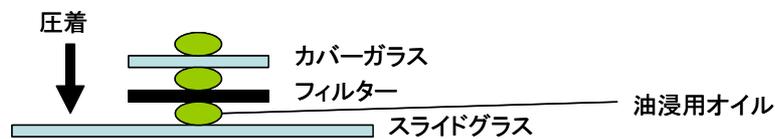
4) バーナーで濾過器具等を滅菌する。

5) フィルター0.22 μ m を濾過器にセットする。

6) 反応液を濾過

7) 下記のようなプレパラートを作成する。

ピンセット等でプレパラートをしっかりと密着させる。



8) 蛍光顕微鏡で観察

- ① 1試料について、フィルター3枚を調製し、各 100 視野計測し、平均値を算出する。
- ② バックグラウンドとしてフィルターのみ(ネガコン)を計測する。

9) 繰り返す場合

- ① スライドガラス: アルコールで洗浄
- ② ファンネル: バーナー滅菌

4. 生菌数の測定「Fluorescein diacetate」

(1) 材料

1) 材料

	材料名	数量(容量)	備考
	フィルター濾過セット	1	径 25mm
	イソポアフィルター	3以上/検体	径 25mm、0.22 μ m
	カートリッジメンブレンフィルター	1/検体	0.22mm
	プラスチック滅菌シリンジ	1	1ml
	スライドガラス	2以上/検体	
	カバーガラス	2以上/検体	
	ガスバーナー	1	
	ピンセット	1	
	1.5ml サンプルチューブ	2以上/検体	オートクレイブ処理。 全菌および生菌数測定用。
	チップ 0.1-10ml		オートクレイブ処理。

2) 試薬

	材料名	数量(容量)	備考
	1mM Fluorescein diacetate in EtOH		1mM in EtOH を終濃度とする。
	70%アルコール		
	油浸オイル(IMMERSION OIL)		

注意) 器具はすべて酸洗浄(1~0.1N)

(2) 操作

1) 試料を用意する。

- ① 試料はバイアルビンにシールして入っているのが望ましい。
- ② 試料滅菌シリンジでバイアルビンから取り出す(N₂ガスで置換するのが望ましい)。

2) 1.5ml チューブに試料 0.9ml と試薬 100 μ l を加える。

3) 15min 反応させる

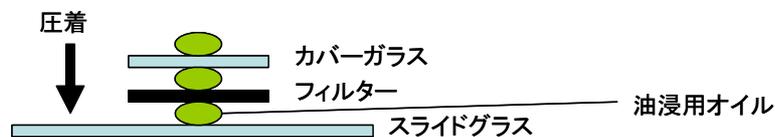
4) バーナーで濾過器具等を滅菌する。

5) フィルター0.22 μ m を濾過器にセットする。

6) 反応液を濾過

7) 下記のようなプレパラートを作成する。

ピンセット等でプレパラートをしっかりと密着させる。



8) 蛍光顕微鏡で観察

- ① 1試料について、フィルター3枚を調製し、各 100 視野計測し、平均値を算出する。
- ② バックグラウンドとしてフィルターのみ(ネガコン)を計測する。

9) 繰り返す場合

- ① スライドガラス: アルコールで洗浄
- ② ファンネル: バーナー滅菌