

ソニーSA3800による大腸菌の取扱い

背景

フローサイトメーターは、もともとリンパ球の解析/分取を目的に開発された装置であり、細胞の取扱いを主要な用途として広く用いられていますが、原理的には溶液に懸濁されたあらゆる微粒子の取扱いが可能です。こうしたことから、細菌やプランクトンなどの微生物の取扱いも重要なアプリケーションの一つとなっています。

しかし、特に大腸菌などサブミクロンサイズの対象を扱おうとする場合、径5umないしそれ以上が殆どである細胞とは異なる取扱いが必要になります。

このテクニカルノートでは、サブミクロンサイズの対象の例として、大腸菌の解析を取り上げ、こうしたサブミクロンサンプルを取扱う際の注意点やポイントを説明します。

ソニーフローサイトメーターでは、蛍光染色に頼ることなく、FSCトリガのみでの大腸菌検出が可能ですので、無染色サンプルを含む多重染色の解析も容易に行うことが出来ます。

SYTO9/PI二重染色による生死判定

FSCトリガ/散乱光プロットで大腸菌集団を特定し、ダブレット除去の後、SYTO9とPIで展開しました。SYTO9は生菌/死菌共に染め、 Propidium Iodideは死菌のみ染めた上で共存するSYTO9を減光させますので、生菌が右側、死菌が左側に現れます。

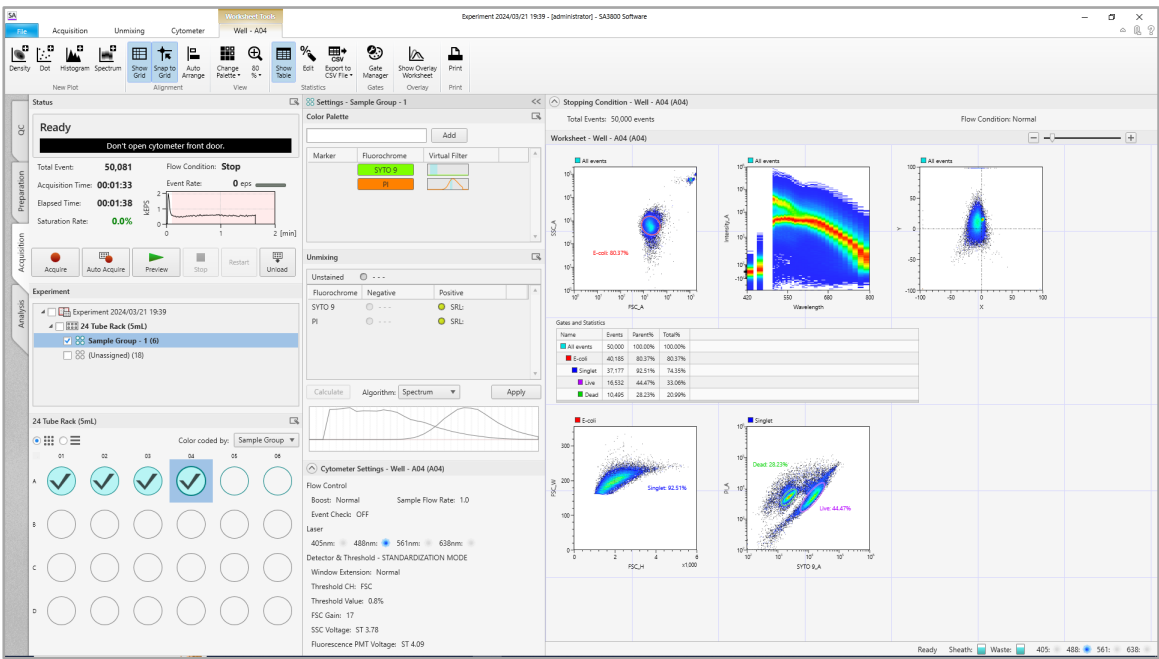


Fig.1: SYTO9/PI二重染色による生死判定

SA3800による大腸菌解析

アナライズにおける一般的な注意点

1. 散乱光による対象識別

ソニーフローサイトメーターでは、FSCトリガでの大腸菌検出が可能で、無染色の大腸菌を識別することが出来ますが、大腸菌は細胞の1/10程度のサイズなので、**細胞と同じ設定のままではThresholdで足切りされ、フローサイトメーターに認識されません**。従って、以下の方針での対応が必須です。

1. FSCゲインは高く/Thresholdは低めに設定
ゲインを高く設定することで微小ターゲット(=相対的に低いFSC輝度)の信号を出来るだけ引き上げ、Thresholdを低く設定することにより出来るだけ拾い上げるのが基本です。
2. 散乱光(FSC/SSC)プロットはLog表示
通常リニア表示を使う散乱光プロットですが、**Log表示**を使うことで、微小ターゲットを見やすく表示することが出来ます。

2. ノイズとの区別

ただ単にThresholdを低くしますと、デバイスや回路自体が発生させる**電気ノイズをイベントとして拾ってしまう**ことがあります。他方、ゴミなどのノイズ(Debris)は出来るだけ識別して排除することが望ましいので、電気ノイズを検出しないギリギリを狙って設定します。

1. まずMilliQなどの微粒子が除去された溶液を流し、サンプル液に含まれる微粒子による信号が、極力観測されない状態にした上で、Thresholdを最低レベルに設定し、電気ノイズの領域を確認します。確認後、ノイズ信号を識別対象と見做さないよう、少しずつThresholdを上げて、電気ノイズを認識しなくなるギリギリにThresholdを設定します。これにより、検出限界まで使って解析を行うことが出来ます。
2. 必要に応じて、培地など懸濁前のサンプル懸濁溶液を流して、懸濁溶液中にある微小成分などのノイズの領域を予め確認します。このノイズ領域ではない部分に出てきた集団が、目指すターゲットです。

サンプル調製

今回、大腸菌を培養し、解析例として生死判定試薬による生死判定を取り上げます。

- 大腸菌: DH5 α (バイオダイナミクス研究所 DS220)
- 生死判定試薬: LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit, for flow cytometry (Thermofisher L34856)
- LB寒天培地プレート(抗生剤無添加)(ユニータック LBA-ABF)
- LB液体培地(抗生剤無添加)(ユニータック LB-ABF-L)
- DPBS, no calcium, no magnesium(Gibco 14190144)
- Propidium Iodide(PI) Solution(Sony 2706505)

1. メーカー所定のプロトコルにより大腸菌DH5 α を解凍懸濁しLB寒天培地プレートに塗布して裏返しで一晩37°Cインキュベート
2. LB寒天培地プレート上に出来たコロニーを一つ選び、液体培地に移して37°Cでインキュベート/培養
3. 大腸菌が増殖した液体培地から15mLチューブに1mL分注し、60°Cのウォーターバスに1分間浸して死菌サンプルを作成
4. BacLightキットのマニュアルに従い、以下のサンプルを各1,000uL調整した
 - a. Unstain: 生菌+死菌+PBS
 - b. SYTO9 Single Stain: 死菌+PBS+SYTO9溶液
 - c. Propidium Iodide(PI) Single Stain: 死菌+PBS+PI溶液
 - d. Sample: 生菌+死菌+PBS+SYTO9溶液+PI溶液

SA3800による大腸菌解析

Experiment作成

Spectral LibraryにインポートされているReference SpectraからSYTO9とPIを選択してExperimentを作成します。

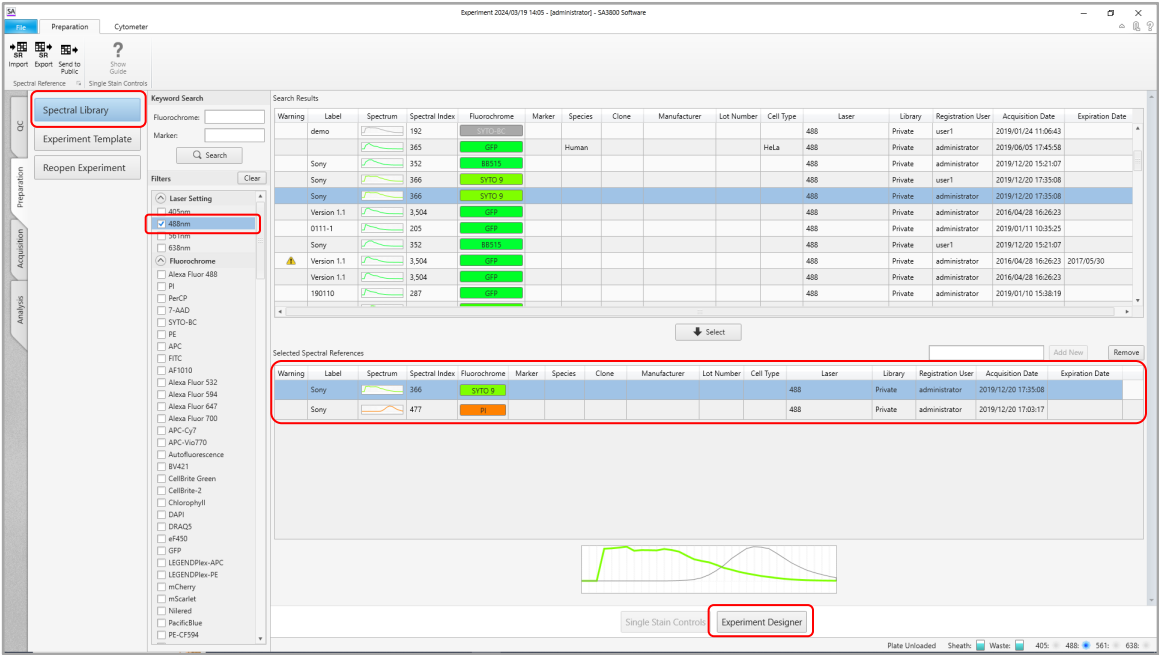
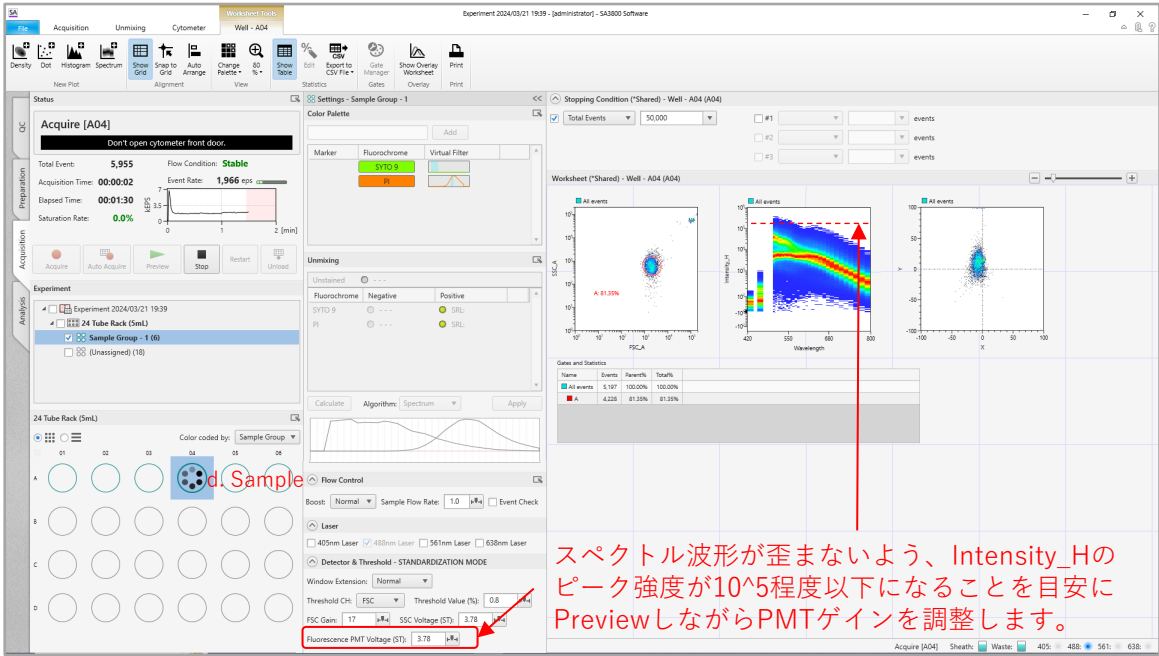


Fig.2: Experimentの作成

蛍光PMTゲインの設定

SYTO9とPIの2重染色サンプル(準備した d. Sample)で蛍光PMTゲインを決定します。



スペクトル波形が歪まないよう、Intensity_Hのピーク強度が10^5程度以下になることを目安にPreviewしながらPMTゲインを調整します。

Fig.3: 蛍光PMTゲインの設定

SA3800による大腸菌解析

コントロールサンプルの記録

解析は多重染色サンプルのみで行えますが、無染色と各シングルステインサンプルも記録しておく、解析結果の解釈に役に立つことがあります。

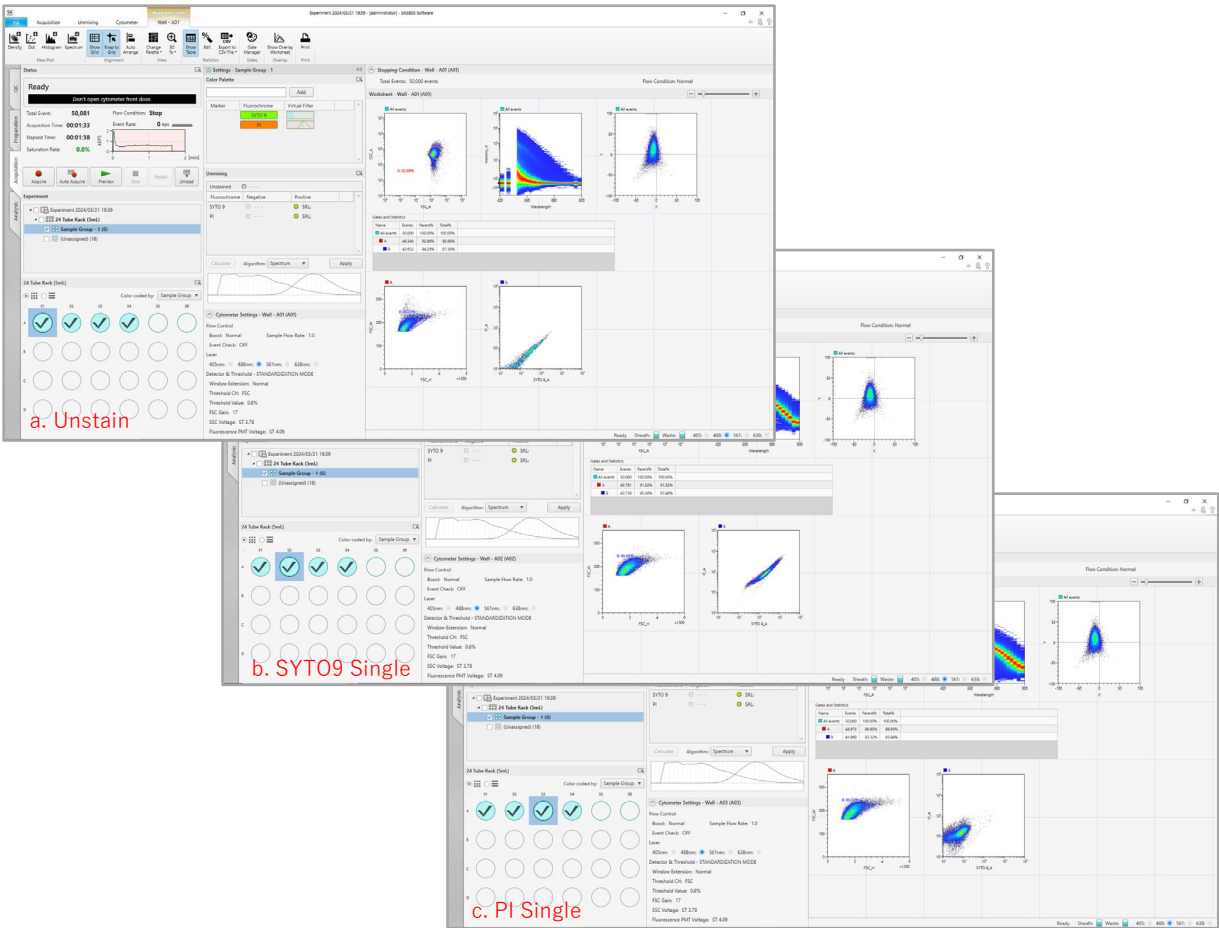


Fig.4: コントロールサンプルの記録

生死判定(冒頭ページ)

d. Sampleのプロットを整理します。

SYTO9は生菌/死菌共に染め、 Propidium Iodideは死菌のみ染めた上で共存するSYTO9を減光させますので、生菌が右側、死菌が左側に現れます。詳細はBacLightキットのマニュアルをご確認ください

スペクトル型セルアナライザーSA3800

多数のサンプルを高速・簡便に解析できる全自動スペクトル型セルアナライザー

- 先進のスペクトル光学技術による高精度かつ安定した解析
- 機器管理から解析までの快適なワークフローを実現
- 日々の実験をより効率的にする384対応3Dオートローダーとシンプルで直感的な操作/設定



発行元

ソニー株式会社

ライフサイエンス&テクノロジー事業部

ライフサイエンス事業部門

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

URL: <http://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

