



Application Note AN-RS-047

# ラマン分光による微生物の迅速な同定と代謝物検出

## 細菌分析のための簡単で非破壊的な分析方法

微生物は地球上で最も多様な生命体の一つです。それらは独自の特性を示し、生態系の栄養素および物質循環において重要な役割を果たします。微生物はヨーグルトやアルコール飲料を含む食品生産や環境汚染物質の浄化に不可欠です。さらに、微生物の遺伝子改変はインスリンのような貴重な製品の生産を促進します。その重要性を考慮し、多くの国が微生物を保存し蓄積するために、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)やスイス微生物コレクション(SCM)などの専門的な機関を設置し、そ

れを維持しています。

従来、細菌などの微生物の同定には遺伝子構成のシーケンシングを用いていました。このプロセスには専門的な訓練と高価な設備が必要です。しかし、ラマン分光法は細菌同定や培養によって生成される代謝物の検出に有望なツールとなりえ、生物プロセスや生態系における機能への深い洞察を可能にします。メトロームのラボ用ラマン分光計には、細菌培養計測用の785 nmおよび1064 nmラマンオプションが用意されています。

## はじめに

ラマン分光法は、細菌の同定や代謝物のモニタリングの可能性から微生物学で広く使用されています。地球上のすべての生物は、炭素、水素、酸素、窒素、リン、硫黄、およびその他の微量元素で構成されています。これらの元素は結合してDNA、脂質、アミノ酸、その他の生体分子を形成します。これらの

生体分子の組成は生物間で異なります。一部の細菌は環境条件に応じて代謝物(例:ポリリン酸やグリコーゲン)を蓄積します。細菌のラマンスペクトルはこれらの化学的差異を反映し、それらの同定と生物プロセスにおける役割の解明を可能にします。

## 実験

リソジェニーブロス(LB)寒天培地は、メーカー(シグマアルドリッチ)仕様に従い、LB粉末と寒天粉末を脱イオン水に溶解して調製しました。オートクレーブ後、混合物を滅菌したガラスペトリ皿に注ぎ、冷却しました。LB寒天が固化したら、指を表面に押し付けて細菌を培地に移しました。その後、ペトリ皿

細菌コロニーのラマンスペクトル(図2)には、さまざまなアミノ酸( $1001$ 、 $1156$ 、および $1654\text{ cm}^{-1}$ )およびDNA( $723$ 、 $669$ 、および $1337\text{ cm}^{-1}$ )を表すピークが含まれていました。これらの特徴は細菌で一般的に観察され、i-Raman Prime 785の微生物分析が可能なことを示唆しています[1]。

を室温で培養し、細菌コロニーが観察されるまで待ちました。

ペトリ皿をBAC150BプローブホルダーとBAC151Cビデオ顕微鏡下に置き、コロニーと培地からのラマンスペクトルを測定しました(図1)。機器構成と測定パラメータは表1に示しています。

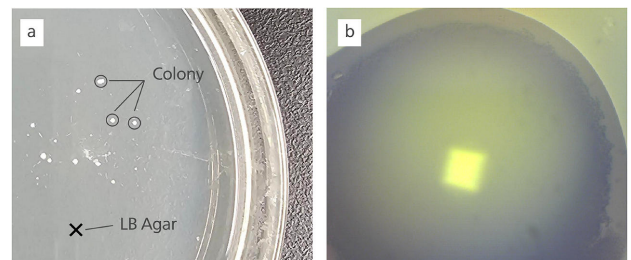
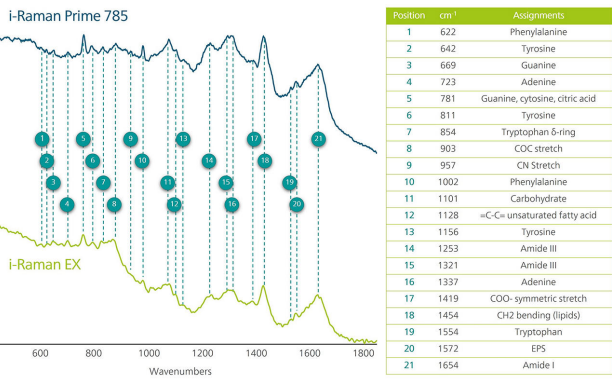


図1. LB寒天上に形成された細菌コロニー (a)、BAC151C + 50x対物レンズ下でのコロニーの拡大図 (b)

表1. 本研究で使用した機器構成と測定パラメータ \* 測定パラメータはコロニーの特性に応じて異なります。

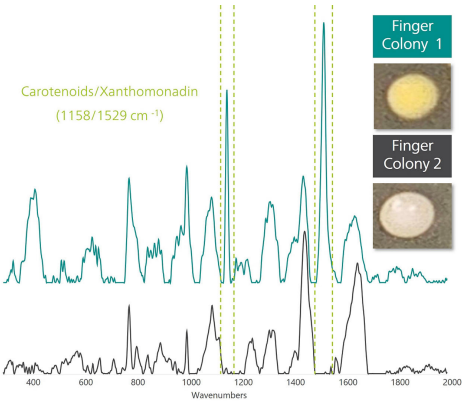
| 機器構成              | プローブホルダー (BAC150B) | ビデオ顕微鏡 (BAC151C) |
|-------------------|--------------------|------------------|
| i-Raman Prime 785 | BAC102-785HT       | 50x objective    |
| i-Raman EX        | BAC102-1064HT      | 50x objective    |
| BWSpecソフトウェア      |                    |                  |
| 測定パラメータ*          |                    |                  |
| レーザー出力 (%)        | 30–100             |                  |
| 積算時間              | 3–60 s             |                  |
| 平均回数              | 3–5                |                  |



(2)(100111561654 cm<sup>-1</sup>)DNA(7236691337 cm<sup>-1</sup>)i-Raman Prime 785[1]  
785 nm1064 nm785 nmCCDInGaAs1064nm()

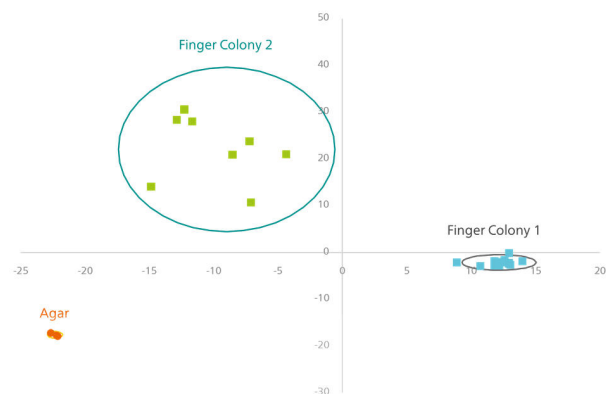
2. i-Raman Prime 785i-Raman EXLB[1]

LB2()(3)2[1]



3. LB

(PCA)(4)



4. LBPCA0.95

- 1064 nm

785nm1064nm  
PCA

i-RamanBWSpec

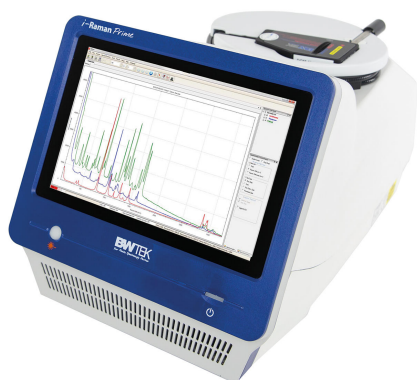
1. Paret, M. L.; Sharma, S. K.; Green, L. M.; et al. Biochemical Characterization of Gram-Positive and Gram-Negative Plant-Associated Bacteria with Micro-Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2010**, 64 (4), 433–441. DOI:10.1366/000370210791114293

## CONTACT

143-0006 6-1-1  
null 9

metrohm.jp@metrohm.jp

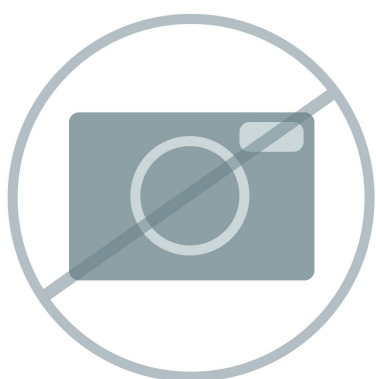
## 装置紹介



### i-Raman Prime 785S

i-Raman® Prime 785S は、タブレット PC および光ファイバーサンプルプローブ内蔵の、低ノイズかつ高スループットの完全一体型のラマンシステムです。このポータブル型ラマンスペクトロメーターは、高い量子効率、TE 冷却 ( $-25^{\circ}\text{C}$ )、ならびに高いダイナミックレンジを備えた CCD アレイ検出器を使用し、リアルタイムでの定量化と同定を含む研究レベルでのラマン分析を提供します。高スループットにより、傑出した信号対雑音比のラマンスペクトルを得ることができるので、速いプロセスの測定、および最も弱いラマン信号でさえもが可能となり、サンプルの微細な相違も検出できます。

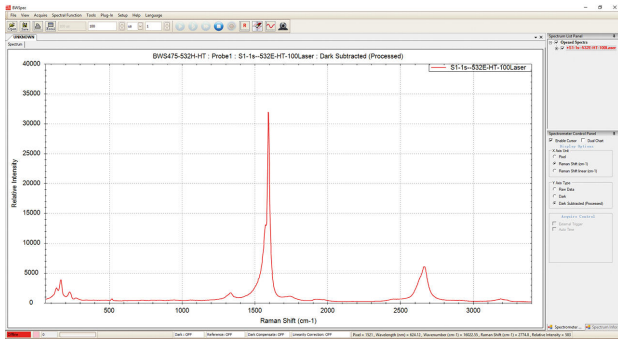
i-Raman Prime 785S には、そのポータブル式の構造に加え、幅広いスペクトル領域と高い分解能というユニークな組み合わせが装備されているため、 $150\text{ cm}^{-1}$  から  $3350\text{ cm}^{-1}$  までの測定が可能です。i-Raman Prime はバッテリーでの稼働が可能なので、容易に持ち運びができます。そのため、場所を選ばず、高精度かつ質的、量的に価値の高いラマン分析を研究レベルで実施することができます。システムは、不透明なパッケージ越しの分析用の、弊社 STRaman® テクノロジーの使用向けに最適化されました。



### 50

マイクロスコープ対物レンズ、無限補正、50倍拡大、作業距離 (mm) = 9.15、焦点距離 (mm) = 4、開口数 (NA) = 0.55。

RML150A



## BWSpec

BWSpec<sup>®</sup> は、リアルタイムによるピークとトレンドの分析を含む装置のコントロール、データ取得に適したB&W Tekの分光法ソフトウェアです。BWSpec は、あらゆるB&W Tek ポータブルラマンシステムおよびスペクトロメーター製品のご購入時に含まれる操作用ソフトウェアです。広範囲なアプリケーションのための機能を含み、ボタン1つで複雑な測定および計算を行ないます。複数のデータ形式に対応し、積分時間やレーザー出力コントロール等、測定パラメータを最適化するためのオプションが含まれています。データ取得およびデータ処理に加え、自動ダーク除去、スペクトルスムージング、ベースライン補正、ピークモニタリングおよびトレンド分析といった各種機能を提供しています。



## i-Raman EX

i-Raman<sup>®</sup> EX は、数々の受賞歴を誇る i-Raman 携帯型スペクトロメーターシリーズの一つであり、特許取得済みの 1.064 nm 励起の CleanLaze<sup>®</sup> レーザーを搭載したスペクトロメーターです。高感度 InGaAs アレイ検出器と TE 深冷、高ダイナミックレンジ、高スループット分光器設計により、自家蛍光を発生させずに高い S/N 比を実現し、天然物、生体サンプル(細胞培養など)、着色サンプルなどを幅広く測定できる携帯型ラマンスペクトロメーターです。

i-Raman EX は、 $100\text{ cm}^{-1}$  から  $2.500\text{ cm}^{-1}$  までの範囲のスペクトルをカバーしており、指紋の全領域を測定することが可能です。システムの設置面積が小さく、軽量設計、低消費電力で場所を選ばず、研究レベルのラマン分析が可能です。また、解析機能を拡張するために、当社独自の Vision ソフトウェアや多変量解析ソフトウェア BWIQ<sup>®</sup>、識別ソフトウェア BWID<sup>®</sup> と組み合わせて使用することができます。i-Raman EX により、蛍光を伴わない品質分析および定量分析のための高精度のラマンソリューションを常に使用することができます。

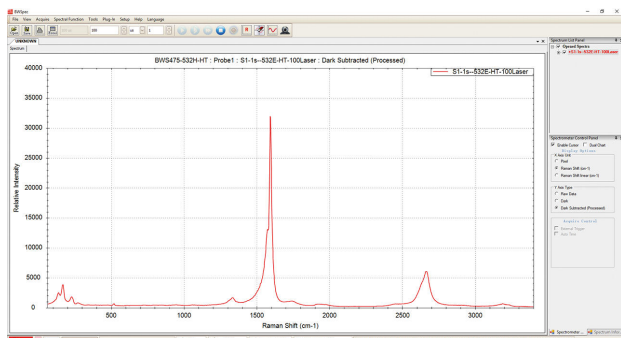
BWS485III



50

マイクروسコープ対物レンズ、無限補正、50倍拡大、作業距離 (mm) = 9.15、焦点距離 (mm) = 4、開口数 (NA) = 0.55。

RML150A



## BWSpec

BWSpec<sup>®</sup> は、リアルタイムによるピークとトレンドの分析を含む装置のコントロール、データ取得に適したB&W Tekの分光法ソフトウェアです。BWSpec は、あらゆるB&W Tek ポータブルラマンシステムおよびスペクトロメーター製品のご購入時に含まれる操作ソフトウェアです。広範囲なアプリケーションのための機能を含み、ボタン1つで複雑な測定および計算を行ないます。複数のデータ形式に対応し、積分時間やレーザー出力コントロール等、測定パラメータを最適化するためのオプションが含まれています。データ取得およびデータ処理に加え、自動ダーク除去、スペクトルスムージング、ベースライン補正、ピークモニタリングおよびトレンド分析といった各種機能を提供しています。