

菌士郎[®] ATP 発光キット Ver.2 (LL100-1-2)

取扱説明書

I.	キットの概要	2
II.	製品構成	2
III.	使用方法	3
IV.	参考データ	7
V.	トラブルシューティング	8
VI.	関連製品	8
VII.	使用上の注意	9

保存温度	-20°C ※調製後の ATP 発光試薬:-80°C(遮光)
使用期限	外箱に記載

I. キットの概要

菌士郎®ATP 発光キット Ver.2 「LL100-1-2」は、ATP(アデノシン三リン酸)測定用キットです。発光量をルミノメーターで測定することにより、サンプル中の ATP 量を高感度に測定できます。

※別売の ATP 抽出試薬(メーカーコード:LL100-2)を使用することにより、菌中の ATP を約 10 秒で抽出することが可能です。本キットを用いて、抽出された ATP 量を測定することで、サンプル中の菌数を高感度に短時間で測定できます。

ホタル・ルシフェラーゼ発光反応は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化を通して光を生じる反応です。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg²⁺)の存在下において ATP と反応した後、酸素(O₂)と反応して励起状態のオキシルルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に光を発します(図 1)。

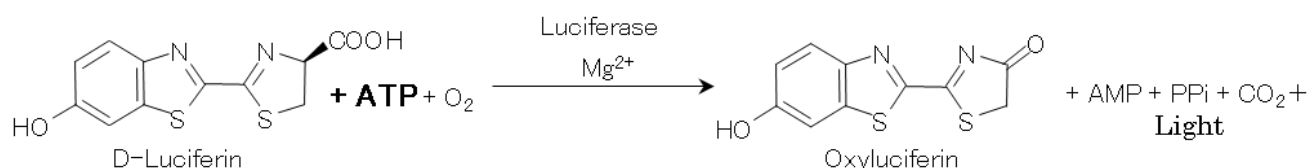


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
菌士郎® ATP 発光キット Ver.2	LL100-1-2	・ATP 発光試薬 Ver.2 (凍結乾燥品) ・発光試薬溶解液(12ml) ・ATP 標準試薬(1 × 10 ⁻⁷ M, 5ml)

Ⅲ. 使用方法

☞試薬への ATP の混入を防ぐため、全操作に渡り、手袋およびマスクの着用をお勧めします。

<キット構成成分以外に必要な試薬>

ATP 抽出試薬 (別売あり:LL100-2)、 (必要に応じて、ATP 除去試薬 (別売あり:LL100-3))

試薬の準備	
ATP 発光 試薬の調製	<ol style="list-style-type: none">1. 発光試薬溶解液、ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)は温度による影響を受けます。24℃以上でのインキュベートや、長時間の室温での放置は避けて下さい。2. ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)が入ったバイアル瓶のゴム栓をゆっくりと開け、発光試薬溶解液 12ml(全量)を添加して、再度ゴム栓を閉じます。 ☞バイアル瓶内は陰圧状態です。開封時にパウダーが飛散しないよう、ゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れてからゴム栓を外して下さい。3. バイアル瓶をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。4. バイアル瓶を室温で 1 時間静置し、試薬を馴染ませます。 ☞ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)に発光試薬溶解液を加えて調製した“ATP 発光試薬(調製済)”は、<u>-80℃にて遮光保存して下さい。</u> <p>◆本試薬は、光や温度、物理的な刺激による影響を受けます。直射日光が当たる場所や蛍光灯の真下での作業、試薬融解時の 24℃以上でのインキュベートや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けて下さい。また、一度の測定で使い切らない場合は、凍結融解の繰り返しを避けるため、<u>必要量ずつ小分けにして -80℃で遮光保存することをお勧めします。</u></p>
ATP 標準 試薬	☞一度の測定で使い切らない場合は、必要量ずつ小分けにし、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。

サンプル調製液や ATP 抽出液 (別売の LL100-2 以外) によるルシフェラーゼ発光反応の阻害確認 (必要に応じて実施)

サンプル調製用の緩衝液が発光反応を阻害しないかどうかの確認

1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
2. ご使用のサンプル調製用緩衝液を用いて、ATP 標準試薬を 10 倍希釈し、“ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (緩衝液 ver)” を調製します。
3. 2と同様の操作を滅菌水で行い、“ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (滅菌水 ver)” を調製します。
4. 測定用チューブ 2 本に、2. または 3. で調製した ATP 溶液 100 μl を移します。
 - ☞ チューブ 1 : $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (緩衝液 ver)
 - チューブ 2 : $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (滅菌水 ver)
5. 各チューブに、室温に戻した ATP 発光試薬 (調製済) 100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。
 - ☞ ATP 発光試薬 (調製済) を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。
 - また、ATP 発光試薬 (調製済) の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。
 - ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する

◆チューブ 1 および 2 の発光量の差異を比較し、発光阻害の程度を確認します。

ATP 抽出液が発光反応を阻害しないかどうかの確認

(別売の LL100-2 以外を使用する場合)

1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
2. 滅菌水で ATP 標準試薬を 10 倍希釈し、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液を調製します。
3. チューブ 2 本に、2. で調製した ATP 溶液を 100 μl ずつ分注します。
4. 3. のチューブに、ご使用の ATP 抽出液 100 μl または滅菌水 100 μl を添加し、攪拌します。
 - ☞ チューブ 1 : ご使用の ATP 抽出液 100 μl を添加
 - チューブ 2 : 滅菌水 100 μl を添加
5. 4. で調製した溶液 100 μl をそれぞれ測定用チューブに移します。
 - ☞ 測定用チューブ 1' : チューブ 1 の液 100 μl (ATP 溶液 + ATP 抽出液)
 - 測定用チューブ 2' : チューブ 2 の液 100 μl (ATP 溶液 + 滅菌水)
6. 各測定用チューブに、室温に戻した ATP 発光試薬 (調製済) 100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。
 - ☞ ATP 発光試薬 (調製済) を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。
 - また、ATP 発光試薬 (調製済) の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。
 - ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する

◆測定用チューブ 1' および 2' の発光量の差異を比較し、発光阻害の程度を確認します。

<測定プロトコル> 検体中の ATP 量の測定

①	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> 1. 検体 100 μl をチューブに入れます。 ☞ご使用のサンプル調製用緩衝液がルシフェラーゼ発光反応を阻害しないかどうかの確認は、“ルシフェラーゼ発光反応の阻害確認(4 ページ)”を参照して下さい。 2. 必要に応じて、ATP 除去試薬(別売:LL100-3) 100 μl を添加し、15~30 分間、室温で静置します。 ☞サンプル溶液中に多量のバックグラウンド ATP が存在する場合、ATP 抽出操作の前に、バックグラウンド ATP の除去操作が必要となります。 3. お持ちの ATP 抽出試薬をチューブに添加し、ATP を抽出します。 (別売品の LL100-2 を使用する場合は、100 μl を添加し、10 秒間静置して溶菌します。) ☞ご使用の ATP 抽出液がルシフェラーゼ発光反応を阻害しないかどうかの確認は、“ルシフェラーゼ発光反応の阻害確認(4 ページ)”を参照して下さい。
②	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> 4. ATP を抽出した 3.の溶液から 100 μl を抜き取り、発光測定用チューブに移します。 5. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。 ☞ATP 発光試薬(調製済)を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。 ex)発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する
③	ATP 量の算出	<ol style="list-style-type: none"> 6. ATP 濃度と発光量から作成した検量線(6 ページ参照)を用いて、検体中の ATP 量を算出します。

☞測定毎に、同濃度の ATP 溶液を用いて試薬の発光活性を確認することをお勧めします。

【“ふき取り検査”による清浄度検査を実施する場合のプロトコル例】

※滅菌綿棒などは別個用意して下さい。

- i) 滅菌された綿棒を PBS(滅菌済)または滅菌水に浸し、十分に湿らせる
- ii) i)の綿棒を用いて、10cm×10cm の範囲をふき取る(ex 縦 10 回+横 10 回+斜め 5 回)
- iii) 250 μ l の PBS(滅菌済)または滅菌水(1.5ml チューブに入れたもの)に ii)の綿棒を入れ、綿棒を上下に動かして、綿棒に付着している菌を溶液中に落とす
- iv) iii)の溶液を検体として、上記測定プロトコルに従って菌由来の ATP を測定する

※菌由来の ATP だけでなく、洗浄不足などによる食物残渣由来の ATP も検出されます。
 正確な生菌数を把握したい場合は、培養法による菌検査を実施して下さい。

<測定プロトコル> ATP 標準試薬を用いた検量線の作成

①	試薬の準備	1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
②	希釈系列の調製	2. サンプル調製用緩衝液を用いて、ATP 標準試薬の 10 倍希釈系列 ($10^{-7} \sim 10^{-12}\text{M}$) または 2 倍希釈系列を調製します。 ☞ 検体中の ATP 濃度を精度高く算出する場合は、10 倍希釈系列の ATP 溶液で作成した検量線によりおおよその ATP 濃度を把握した後、2 倍希釈系列の ATP 溶液を用いて検量線を作成することをお勧めします。 3. 2. で調製した各濃度の ATP 溶液 100 μl を各々チューブに入れます。
③	ATP 抽出	4. 検体中の ATP 量を測定する際に ATP 除去試薬を使用する場合は、検体を測定する場合と同様に ATP 除去試薬を添加します。 5. 検体中の ATP 測定に使用する場合と同様に、ATP 抽出試薬をチューブに添加します。 ☞ 別売品の LL100-2 を使用する場合は、100 μl を添加し、10 秒間、静置します。
④	発光測定	6. 5. の溶液から 100 μl を抜き取り、発光測定用チューブに移します。 7. 室温に戻した ATP 発光試薬 (調製済) 100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。
⑤	検量線の作成	8. ATP 濃度と発光量の対数グラフ (または相関グラフ) を作成します。

<参考データ>

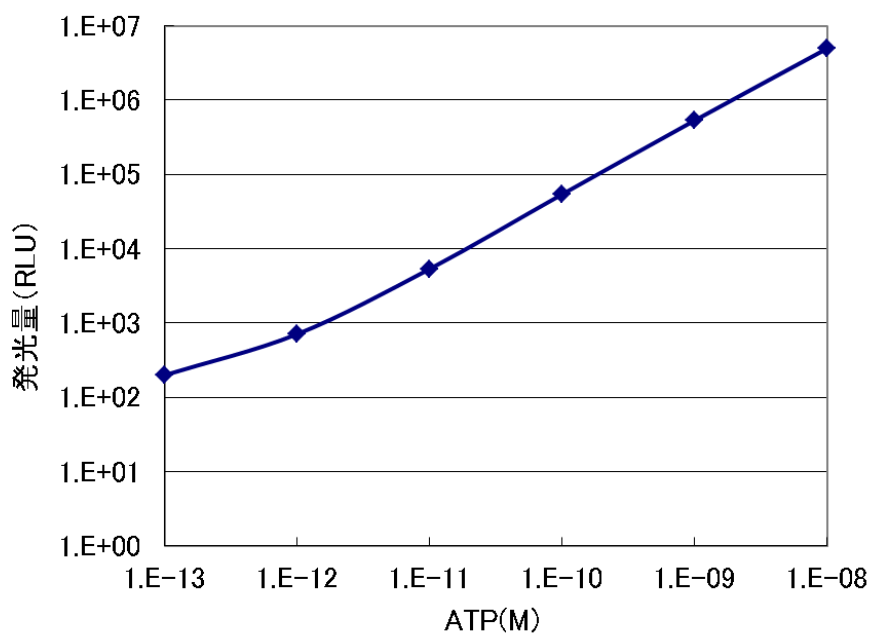


図 2. ATP 濃度と発光量の相関

IV. 参考データ

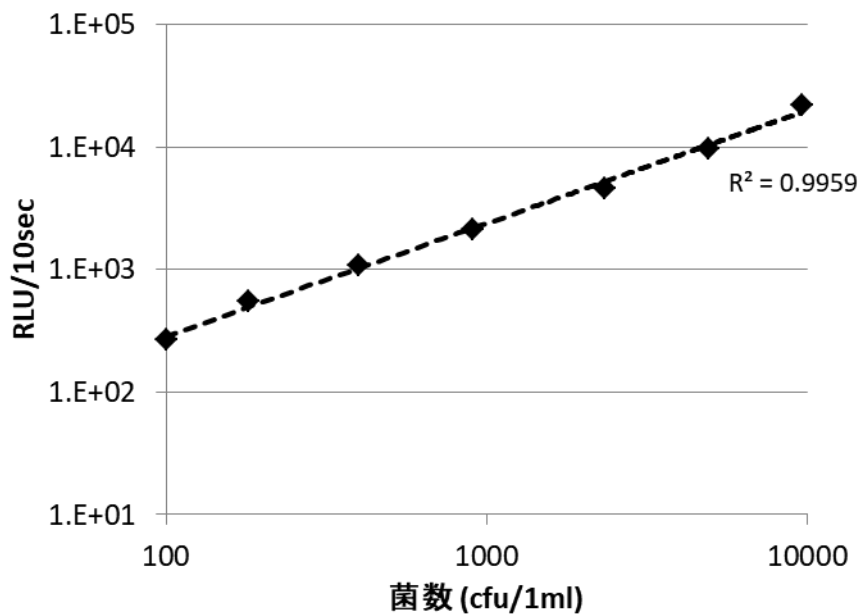


図 3. 菌数と発光量の関係(発光阻害が無いサンプル溶液中の菌数を測定した場合の例)

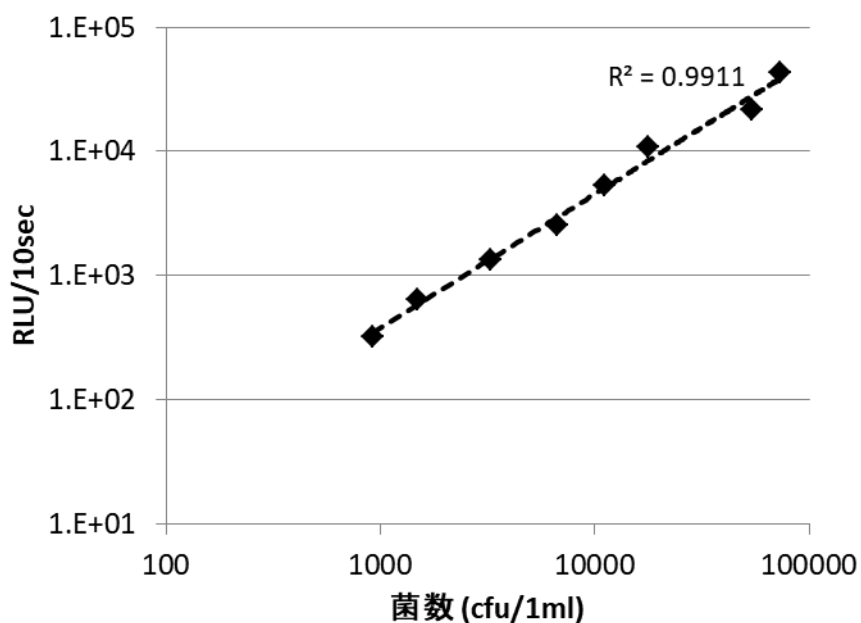


図 4. 菌数と発光量の関係(発光阻害が有るサンプル溶液中の菌数を測定した場合の例)

V. トラブルシューティング

問題	原因	解決法
発光しない。 発光量が低い。	試薬が劣化している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 保存状態により、試薬が劣化している可能性があります。試薬の保存方法を確認して下さい(1 ページ参照)。 ● ATP 標準試薬を用いて、ATP 発光試薬(調製済)の性能確認を行って下さい。
	ATP 発光試薬(調整済)が室温に戻っていない。	● ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。ATP 発光試薬(調製済)が室温に戻っていることを確認して下さい。
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が短い。	● 測定感度はルミノメーターに依存します。1 検体あたりの測定時間(積算時間)を長く設定して下さい。
発光量が高く、ルミノメーターの測定可能範囲を超えている。	検体中の菌数が多い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 事前に、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認して下さい。 ● 検体を希釈して下さい。
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が長い。	● 1 検体あたりの測定時間(積算時間)を短く設定して下さい。
測定値のばらつきが大きい。	発光試薬の添加から測定を開始するまでの時間が異なる。	● ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を各検体で統一して下さい。
	融解後の試薬成分が十分に混ざっていない。	● 融解後の試薬は十分に混合してから使用して下さい。その際、ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避け、転倒混和等により穏やかに攪拌して下さい。

VI. 関連製品

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
菌士郎® ATP 抽出試薬	LL100-2	ATP 抽出試薬(12ml)	4°C
菌士郎® ATP 除去試薬	LL100-3	ATP 除去試薬(12ml)	-20°C

VII. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分して下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合があります。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- 手袋、保護メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けて下さい。試薬類が目に入った場合や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- その他、不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。(9:00～17:30)

問い合わせ先

東洋ビーネット(株)バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目 2 番 1 号
TEL:03-3272-1954 FAX:03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>