

菌士郎[®] 牛乳テスト Ver.2 (KGT2-100)

取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	3
III. 使用方法	4
IV. 測定結果の判定	6
V. トラブルシューティング	7
VI. 使用上の注意	7

保存温度

-20°C

<構成品別の保存温度>

ATP 抽出試薬、発光試薬溶解液、試薬 A : 4°C以下(-20°C可)

ATP 発光試薬、ATP 標準試薬、試薬 B : -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[®]牛乳テスト Ver.2 「KGT2-100」は、ATP 法を利用して、牛乳・生乳・乳飲料中の一般生菌数を迅速に測定する試薬キットです。ATP(アデノシン三リン酸)は、全ての生細胞に存在するエネルギー物質であり、ホタルルシフェリン・ルシフェラーゼと反応することにより発光を生じます。その発光量は ATP 量に比例するため、発光量を測定することにより、サンプル中の一般生菌数を推定することができます。

菌士郎[®]牛乳テスト Ver.2 では、独自に開発した前処理試薬により、牛乳・生乳・乳飲料中の発光阻害成分(タンパク質・脂肪)と菌体を効率よく分離でき、体細胞由来のバックグラウンド ATP を分解することが可能です。そのため、生菌由来の ATP のみを高感度に測定することが出来ます。

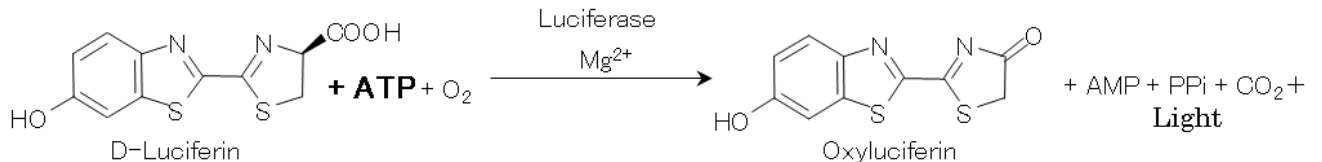
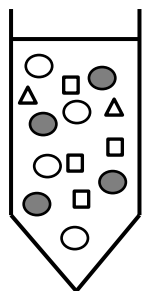


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

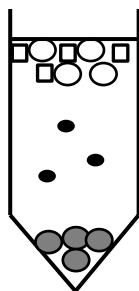
<測定原理>

(1) サンプル



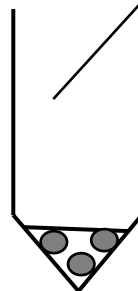
- タンパク質
- 脂肪
- △ 体細胞
- 体細胞由来 ATP
- 菌体

(2) 菌体分離



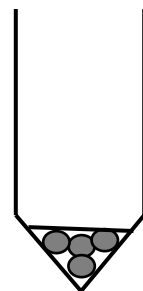
試薬 A により、タンパク質・脂肪を分離し、体細胞を破壊。菌体と完全に分離する。

(3) 除去



分離したタンパク質・脂肪と体細胞由来の ATP を除去。

(4) 発光



試薬 B により菌体以外の ATP を完全に除去し、発光反応。

<特徴>

- 迅速検査 1 サンプル 40 分間で測定が可能
- 高感度 10³cells/ml 以上
- 簡単操作 培養法のような熟練操作を必要としません。
- 生菌測定 通常の培養法では検出が難しい低温・高温細菌も検出可能

II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
菌士郎® 牛乳テスト Ver.2 (100 回用)	KGT2-100	<ul style="list-style-type: none">・ATP 発光試薬 Ver.2 (凍結乾燥品)・発光試薬溶解液 (12ml)・ATP 抽出試薬 (12ml)・ATP 標準試薬 (2×10^{-9}M、5ml)・試薬 A (55ml)・試薬 B (12ml)

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。

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°C 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°C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°C 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°C 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。
試薬 A	☞ 転倒混和により混合し、均一に白濁したことを確認してから使用して下さい。
試薬 B	<p>☞ 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。</p> <p>☞ ボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避け、転倒混和により穏やかに攪拌して下さい。</p>

<測定プロトコル> 牛乳(生乳)中の ATP 量の測定

①	サンプル採取	<p>1. 新鮮な牛乳(生乳、乳飲料)1mlを1.5ml遠心チューブ(滅菌済)に採取します。</p> <p>☞凍結保存した牛乳や長期保存した生乳をサンプルとして用いることは出来ません。</p>
②	前処理	<p>2. 室温に戻した試薬 A 500 μl を添加し、転倒混和(10回)により混合します。</p> <p>3. 12,000 \times g で5分間、遠心分離します(室温)。</p> <p>4. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上層の「クリームパット」および中間層の「半透明層」をアスピレーターで吸引除去します。</p> <p>5. ペレットが残ったチューブに試薬 B 100 μl を添加し、ピペッティングによりペレットを再分散させた後、室温で30分間静置します。</p>
③	ATP 抽出	<p>6. 5.の溶液を測定用チューブに移します(全量:100 μl)</p> <p>7. 室温に戻した ATP 抽出試薬 100 μl を添加し、10秒間静置します。</p> <p>☞ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。氷中では、ATP の抽出が不十分となることがあります。</p>
④	発光測定	<p>8. 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(積算時間 10 秒)。</p> <p>☞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。</p> <p>ex)発光試薬の添加から5秒後に測定を開始する</p>
⑤	生菌数の推定	<p>9. 発光量(ATP 法による発光量の測定値)と生菌数(培養法による生菌数の測定値)から作成した検量線(6 ページ参照)を用いて、サンプル中の生菌数を推定します。</p>

☞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。
(下記参照)

<測定プロトコル> 発光試薬の活性確認 (必要に応じて実施)

①	試薬の準備	<p>1. ATP 標準試薬(2×10^{-9}M)および ATP 発光試薬(調製済)を室温に戻します。</p>
②	発光測定	<p>2. ATP 標準試薬 100 μl を測定用チューブに入れます。</p> <p>3. 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。</p>

IV. 測定結果の判定

ルミノメーターは、相対的発光量 (Relative Light Unit: RLU) という単位で結果を表示します。結果の判定は、「ATP 法による発光量の測定値」と「培養法による生菌数の測定値」の 2 つのデータから作成した検量線をもとに行います (図 2 参照)。

☞ ATP 法ではサンプル中に存在する全ての微生物の ATP を測定しますが、通常の培養法では、一般的に中温で発育する細菌を測定します。そのため、両者のデータを比較した場合、培養法で測定した生菌数よりも ATP 法で測定した発光量の方が高い値を示す場合があります。このような場合には、低温や高温で発育する細菌を専用の培養条件にて確認して下さい。

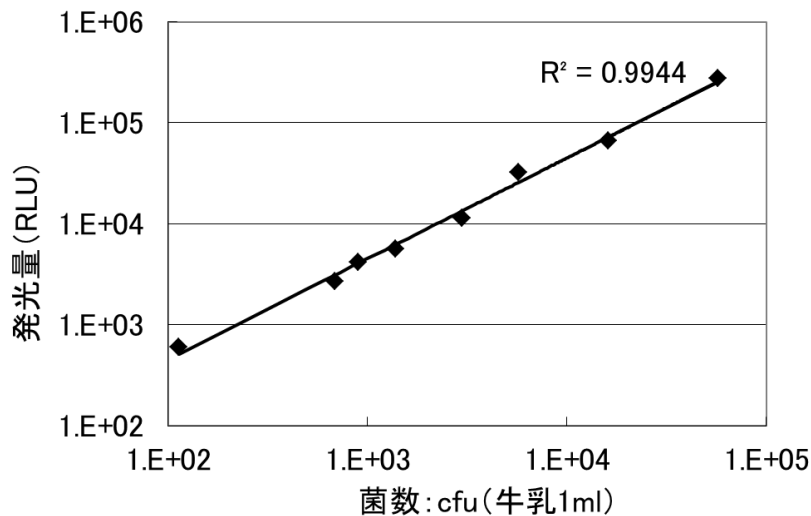


図 2. ATP 発光量と生菌数の関係 (牛乳をサンプルとした場合の測定例)

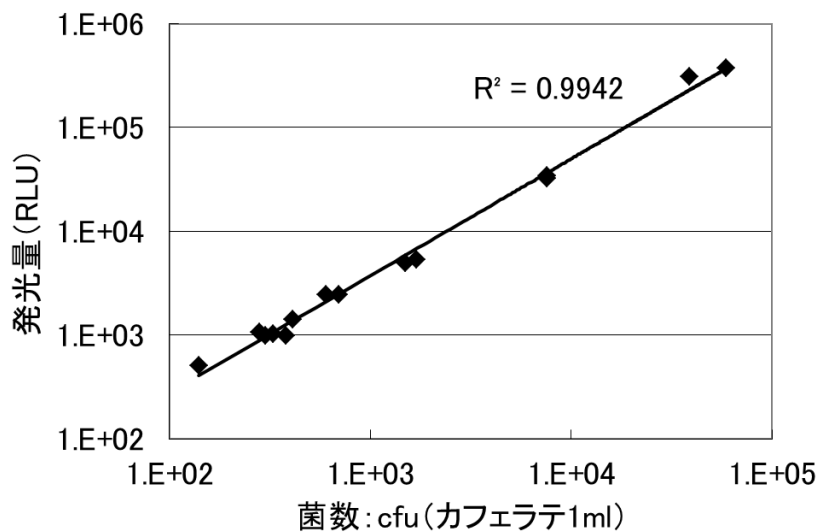


図 3. ATP 発光量と生菌数の関係 (乳飲料をサンプルとした場合の測定例)

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。	検体からのATPの抽出が不十分である。	<ul style="list-style-type: none"> ● ATP 抽出試薬は必ず室温に戻してから使用して下さい。 ● ATP 抽出操作は室温で行って下さい。水中ではATPの抽出が不十分となることがあります。
	試薬が劣化している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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(5ページ参照)。
	ATP 発光試薬(調製済)が室温に戻っていない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
バックグラウンド発光量が高い。	使用器具にATPが混入している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 滅菌済みの器具・容器を使用して下さい。
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。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。

VI. 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/>