

「ルシフェール 250」取扱い説明書

商品コード: 60311



注意！

1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないでください。
2. 取扱い説明書の使用上の注意および取扱い上の注意に従って取扱ってください。

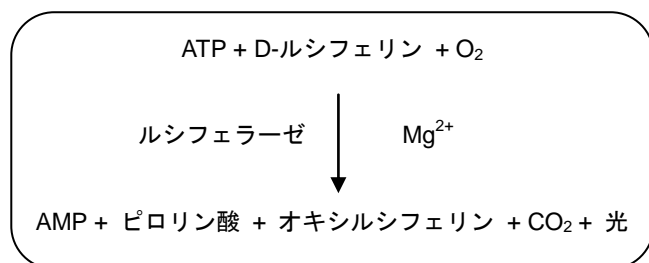
「ルシフェール 250」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、ATP 測定用試薬キットです。

【用途】

本製品は、ATP(アデノシン三リン酸)測定に使用することができます。

【測定原理】

ホタルルシフェラーゼは、以下の反応により光を発します。



反応の結果生じる光の量は ATP 量に比例するので、発光量を測定することにより ATP を定量することができます。

ATP は自然界に広く存在し、また、微生物を始めとする生細胞にはエネルギー物質として含まれています(細胞内 ATP)。細胞内 ATP を測定するには、既知の ATP 抽出法(TCA 法、熱抽出法、界面活性剤法、および有機溶媒法など)により細胞外に ATP を抽出し、測定する必要があります。

【キットの構成】

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
発光試薬	ルシフェリン ルシフェラーゼ 酢酸マグネシウム	凍結乾燥品 5 本
発光試薬溶解液	Tricine 緩衝液	5.5 mL 5 本

【使用上の注意】

本製品の性能を十分に活用していただくため、以下の点にご注意ください。

- ①品質保持期限が切れた製品は使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります(品質保持期限は外箱に記載してあります)。
- ②必ず推奨機器を用いて発光量を測定してください。推奨機器以外を使用しますと、測定を正確に行えないおそれがあります。
- ③本製品は室温(20~30℃)に戻してからご使用ください。冷えたままで使用しますと、測定値が低くなる場合があります。
- ④発光試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。ゴム栓を強い力で開けますと、急激に空気が入り込み、内容物が飛散するおそれがありますので、試薬の調製法に従って開栓してください。
- ⑤ルミチューブやルミテスターが静電気を帯びますと、異常値を

示す場合があります。そのような場合は、ルミチューブやルミテスターを湿った布で拭くなどして、静電気を取り除いてください。

- ⑥使用時は検査用手袋などを着用してください。また、手袋は抗静電性のもの(例えばニトリルゴム製)を使用し、手袋をはめた手でルミチューブをこすらないように気を付けてください。素手で使用しますと ATP や微生物の混入によりブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑦ルミテスターを使用時に、周辺に電気ノイズ(電子レンジ、ミキサーなどが原因となります)が発生しますと、異常値を示すことがあります。周辺に電気ノイズを発生する機器類等が無いことをご確認のうえ、ご使用ください。
- ⑧異なるロット(試薬瓶ラベルに記載)の試薬を混合して使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑨マイクロピペットチップは滅菌済みのもの、または検査用手袋などを着用した上でラックに並べオートクレーブしたものをご使用ください。ATP や微生物が混入するとブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑩本製品をご使用の際は、容器本体の口やキャップの先端に触らないように注意してください。ATP や微生物が混入するとブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑪発光試薬添加後は、ミキサーなどで良く攪拌した上で 20 秒以内に発光量の測定を開始してください。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑫ルシフェラーゼによる発光反応は測定試料中に含まれる緩衝剤や塩の種類、およびその濃度によって影響を受けます。したがって、得られた発光量から ATP 濃度を求めるのに使用する検量線は、必ず測定試料の調製に用いる緩衝液で希釈した ATP 溶液を用いて作成してください。

【測定に使用する推奨機器】

ルミテスター C-110、C-100N、C-100
(販売元:キッコーマンバイオケミファ(株))

【試薬の調製法】

- ①発光試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないように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るようにして開栓してください。
- ②開栓した発光試薬 1 瓶に 1 瓶分の発光試薬溶解液を全量移し入れます(発光試薬溶解液は稀に若干の濁りを生じる場合がありますが、品質には影響がございませんので、そのままご使用ください)。
- ③室温で 5 分程度放置後、泡立たない程度に攪拌して溶解してください。溶解した発光試薬は、一度で使い切ることをお勧めします。止むを得ず保存する場合は、冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)してください。ただし、保存後の発光試薬は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット(商品コード:60260)を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用ください。保存期間は、冷蔵(2~8℃)で 1 週間、凍結(-10℃以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。

〔測定方法〕

1. ATP 検量線の作成

- 1) 本製品の他に準備する器具および試薬
ルミノメーター(ルミテスター C シリーズ)、ルミチューブ(商品コード:60183)、マイクロピペット、滅菌済みマイクロピペットチップ、ルシフェール ATP 標準試薬セット(商品コード:60260)
- 2) 測定操作
ルシフェール ATP 標準試薬セット添付の取扱い説明書に従って $2 \times 10^{-12} \sim 2 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液を作製します。その 0.2 mL をルミチューブに入れ、そこに 0.1 mL の発光試薬を添加します。ミキサーなどで数秒攪拌した上で 20 秒以内にルミテスターにて発光量(RLU: Relative Light Unit)の測定を開始します。
- 3) データの取扱い

ATP 濃度と得られた発光量を両対数グラフにプロットします(図1)。両測定値の間には ATP 濃度で $2 \times 10^{-12} \sim 2 \times 10^{-8} \text{M}$ の範囲において良好な直線関係が認められます。

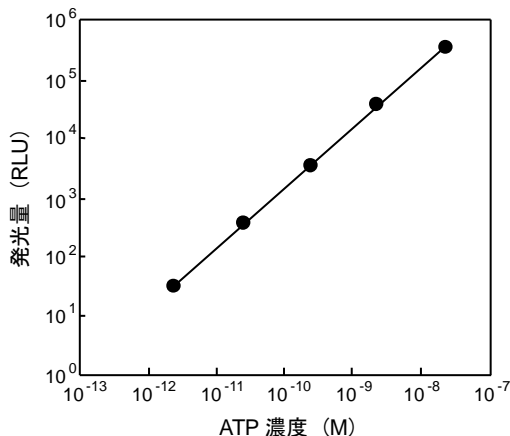


図 1. ATP の検量線

2. 細胞内 ATP の測定

- 1) 本製品の他に準備する器具および試薬
ルミノメーター(ルミテスター C シリーズ)、ルミチューブ、マイクロピペット、滅菌済みマイクロピペットチップ、ATP 抽出に必要な試薬
- 2) 測定試料の調製
細胞内 ATP の抽出法として、TCA 法、熱抽出法、界面活性剤法、および有機溶媒法などが報告されています。試料の性状、生細胞の種類などを考慮し、どの方法で抽出するかご検討ください(参考文献参照)。なお、試料中には、試料由来の細胞外 ATP が含まれています。細胞外 ATP は測定誤差の原因となりますので、別売りのルシフェール ATP 消去試薬セットで前処理した後に ATP 抽出を行ってください。
- 3) 測定操作
2) で調製した試料 0.2 mL をルミチューブに入れ、そこに 0.1 mL の発光試薬を添加します。ミキサーなどで数秒攪拌した上で 20 秒以内にルミテスターにて発光量の測定を開始します。
- 4) データの取扱い
得られた発光量を ATP の検量線にあてはめることにより、ATP 濃度を求めることができます。

〔廃棄の方法〕

発光試薬および発光試薬溶解液の容器はガラス、ゴム、アルミの材質からなっています。廃棄の際は各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理してください。

〔取扱い上の注意〕

本製品を安全にご使用頂くため、以下の点にご注意ください。

- ① 製品を ATP 測定の目的以外には使用しないでください。
- ② 本製品の試薬類を使用前後に口に入れたり、素手で触れたり、目に入れたりしないでください。口に入れた場合は口を良くすすいだ後、皮膚についた場合は大量の水で洗浄した後、また目に入れた場合は大量の水で洗浄した後、直ちに医師に連絡を取り、指示を受けてください。
- ③ 本製品の容器および試薬が食品などへ混入しないよう、保管、廃棄に充分ご注意ください。
- ④ 本製品は幼児の手の届かないところに保管してください。

〔保存方法〕

- 1) キットの保存: 冷暗所(2~8℃)にて保存。
- 2) 試薬開栓後の保存: 開栓後は一度で使いきることをお勧めします。止むを得ず保存する場合、冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)してください。ただし、保存後は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット(商品コード:60260)を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用ください。保存期間は、冷蔵(2~8℃)で1週間、凍結(-10℃以下)で1ヶ月間、凍結融解は3回を限度としてください。
- 3) 品質保持期限: 本製品の外箱に記載。

〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任は負いません。

〔参考文献〕

ATP の抽出法に関する論文を以下に紹介いたします。

- 1) Lundin, A. and Thore, A., Comparison of Methods for Extraction of Bacterial Adenine Nucleotides Determined by Firefly Assay, *Appl. Microbiol.*, 30 (1975) 713-721.
- 2) Hysert, D. W., Kovacs, F. and Morrison, N. M., A Firefly Bioluminescence ATP Assay Method for Rapid Detection and Enumeration of Brewery Microorganisms, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 34 (1976) 145-150.
- 3) Larsson, C. M. and Olsson, T., Firefly Assay of Adenine Nucleotides from Algae: Comparison of Extraction Methods, *Plant & Cell Physiol.*, 20 (1979) 145-155.
- 4) Lundin, A., Extraction and Automatic Luminometric Assay of ATP, ADP and AMP, In Kricka, L. J., Stanley, P. E., Thorpe, G. H. G. and Whitehead, T. P. (ed.), *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence*, Academic press, Inc., London (1984) 491-501
- 5) Vaden, V. R., Webster, J., Hampton, G. J., Hall, M. S. and Leach, F. R., Comparison of Methods for Extraction of ATP from Soil, *J. Microbiol. Methods*, 7 (1987) 211-217.
- 6) Lefebvre, Y., Couture, P. and Couillard, D., An Analytical Procedure for the Measurement of ATP Extracted from Activated Sludge, *Can. J. Microbiol.*, 34 (1988) 1275-1279.

製造元 : **キッコマンバイオケミファ株式会社**
〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498
E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp
URL: <http://biochemifa.kikkoman.co.jp/>