

キッコマン ATP 測定用試薬キット

「ルシフェール 250 プラス」取扱い説明書

商品コード: 60312



警告！

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。

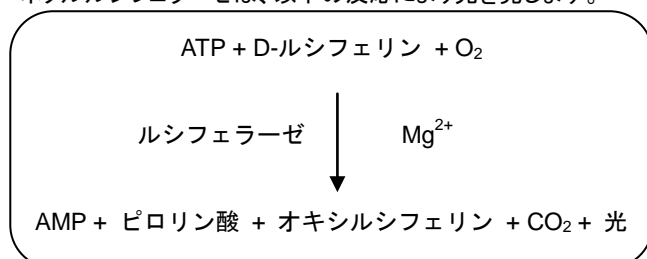
「ルシフェール 250 プラス」は、キッコマンのバイオ技術によって開発された、ATP 測定用試薬キットです。

〔用途〕

本製品は、ATP 測定、ふき取り検査および微生物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 (アデノシン三リン酸) 量に比例するので、発光量を測定することにより ATP を定量できます。ATP は微生物を始めとする生細胞にエネルギー物質として含まれています (細胞内 ATP)。また、生細胞中だけでなく、食品および食品残渣などにも ATP (細胞外 ATP) が多量に含まれています。

本製品に付属している ATP 抽出試薬は、細胞内 ATP を効率よく抽出することができます。従って、本製品で得られる測定値は細胞内 ATP と細胞外 ATP の総和となります。食品工場などではこの総 ATP 量を清浄度の指標とし、工程管理を実施することができます。

一方、測定試料中の細胞外 ATP を消去した後に、細胞内 ATP のみを測定することにより、生細胞数を求めることができます。測定試料中の細胞外 ATP の消去には、別売りのルシフェール ATP 消去試薬セットを併せてご使用ください。

〔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
ATP 抽出試薬	界面活性剤	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。冷えたままで使用すると、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手袋は抗静電性のも (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。
- 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、異常値を示す場合があります。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、またはビニール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。
- ⑫ATP の抽出に必要な時間は、微生物の種類によって異なります (通常は 20 秒で充分です)。正確な測定を行うには、最適時間を求めて一定時間に固定してください。
- ⑬ふき取り検査に使用する綿棒には、メーカーによって多少 ATP が含まれている場合がありますのでご注意ください。推奨品など詳しいことは、お問い合わせください。
- ⑭ふき取り検査を実施する際に使用する清浄度管理の基準値は、適用する条件により異なります。必ず使用する条件にあわせて設定した基準値を用いてください。
- ⑮微生物の種類によっては懸濁された溶液中で飢餓状態となり、ATP の含量が急激に低下することがあります。その場合は、目的とする微生物に適した溶液を用いて測定試料を調製してください。例えば、グルコースやショ糖など糖類の添加が有効です。
- ⑯微生物測定を行う際に使用する検量線は、微生物の種類や用いる培地の組成など使用条件により異なります。必ず使用する条件下で作成した検量線をご使用ください。

〔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

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。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、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(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)。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(キッコーマン食品(株)製、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。

2. ATP 抽出試薬

開栓してそのままご使用ください。一度で使い切ることをお勧めしますが、止むを得ず保存する場合は冷蔵(2~8℃)で保存してください。ATP や微生物の汚染がない限り、1 ヶ月間保存できます。

〔測定方法〕

1. ATP 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)、ルミノメーター用測定チューブ、綿棒、滅菌水、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 $2 \times 10^{-12} \sim 2 \times 10^{-8}$ M の ATP 標品を作製します。その 0.1 mL を測定チューブに入れ、そこに 0.1 mL の ATP 抽出試薬を添加、20 秒後に 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 秒以内にルミノメーターにて発光量(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 $2 \times 10^{-12} \sim 2 \times 10^{-8}$ M の範囲において良好な直線関係が認められ、発光量を測定することにより ATP 濃度を求められることがわかります。

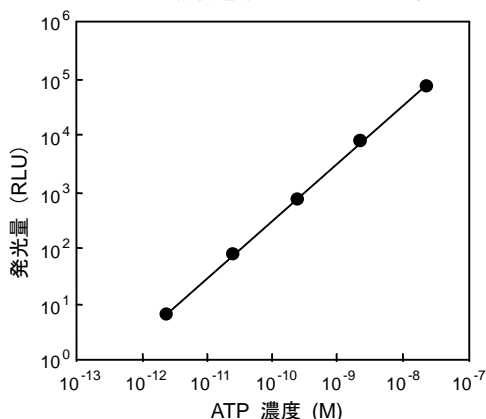


図 1. ATP の検量線

2. ふき取り検査

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)、ルミノメーター用測定チューブ、綿棒、滅菌水、マイクロピペット、滅菌済みマイクロピペットチップ

2) 測定操作

測定チューブに 1.0 mL の滅菌水を入れ、そこに綿棒を浸し、その綿棒で検査対象を一定面積ふき取ります(例えば、10cm x 10cm)。綿棒を測定チューブに戻し、チューブ内壁でよくしごいてふき取った汚れを滅菌水中に洗い出します。そのうち 0.1 mL を別の測定チューブに分注し、そこに 0.1 mL の ATP 抽出試薬を添加、20 秒後に 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 秒以内にルミノメーターにて発光量(RLU: Relative Light Unit)の測定を開始します。

3) データの取扱い

本製品を用いて清浄度管理を行う手法の一例を以下に示します。まず、清浄度が合格あるいは不合格であるかを判定するために、基準値 1、2 を設定します(図 2 参照)。

基準値 1 以下の発光量では清浄度は合格、基準値 2 より高い発光量では不合格であり、洗浄のやり直し、または洗浄工程の見直しが必要となります。また、基準値 1 を越え、基準値 2 以下の発光量では、清浄度は要注意であり、洗浄のやり直し、または洗浄工程の見直しをお勧めします。

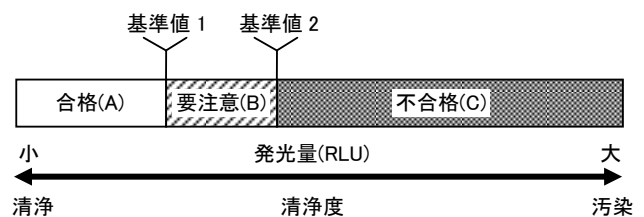


図 2 清浄度管理の基準値設定

次に、基準値設定の例として、食品工場の調理台のステンレス表面、プラスチック製まな板の表面および手指の例を表 1 に示します。

測定対象	発光量 (RLU)	
	基準値 1	基準値 2
ステンレス表面	100	200
プラスチック表面	500	1,000
手指	1,500	3,000

表 1 清浄度管理基準値設定例

表 1 の清浄度管理基準はあくまで参考例であり、基準値として適さない場合もあります。例えば、手指検査の場合、一般的に外科手術を行う直前の医師では 100~200 RLU の発光量しか示しません。このような場合に表 1 の基準を適用して管理を行っても、適切な清浄度レベルを達成することはできません。このように基準値は清浄度判定の重要な指針となりますので、その設定は清浄度レベルにあわせて適切に行ってください。

基準値の設定の際は、ルミテスター添付の解説書をご参照ください。

3. 微生物測定

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)、ルミノメーター用測定チューブ、マイクロピペット、滅菌済みマイクロピペットチップ、ルシフェール ATP 消去試薬セット(商品コード: 60254)

2) 測定試料の調製

- ① 固形試料の場合：ストマッカー、ホモジナイザーなどで試料を処理し、上澄み液を測定に供します。
- ② 液状試料の場合：透明液の場合はそのまま、汚濁液、着色液を含む試料の場合は、緩衝液又は蒸留水で適宜希釈して測定に供します。

上記の手順で調製した測定試料には、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以下の測定を行ってください。

3) 測定操作

測定チューブに調製した試料 0.1 mL を採取します。そこに 0.1 mL の ATP 抽出試薬を添加し、20 秒後に 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 秒以内にルミノメーターにて発光量の測定を開始します。

4) データの取扱い

あらかじめプレート法で求めた微生物数 (CFU: Colony Forming Units) と発光量 (ATP 量に比例) を両対数グラフにプロットし、検量線として用います

測定例として *E. coli* ATCC 25922 の検量線を図3に示します。普通ブイオン培地での一晚培養液を無菌の普通ブイオン培地で希釈し、10 倍希釈系列を作製しました。発光量の測定は、ATP 消去試薬セットを用いて前処理を行った後、上記方法に従って測定しました。微生物数は、標準寒天培地による混釈培養により 35°C で 48 時間培養し、生じたコロニー数から算出しました。

微生物測定を行う際に使用する検量線は、微生物の種類や用いる培地の組成など使用条件により異なります。必ず使用する条件下で作成した検量線をご使用ください。詳細な資料がご入用の場合は、お問い合わせください。

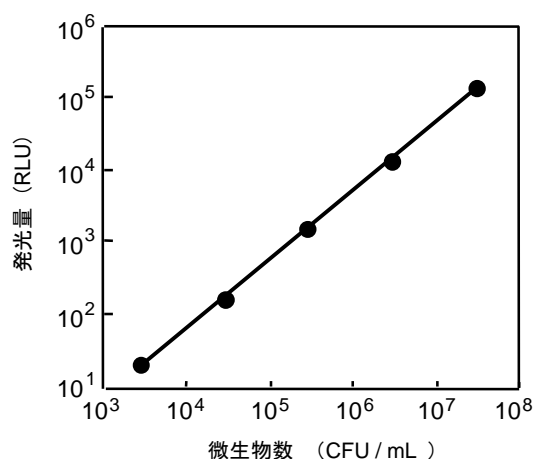


図3 *E. coli* の検量線

【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。ATP 抽出試薬の容器は、本体、キャップともにポリプロピレン製です。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いただくため、以下の点にご注意ください。

- ① 本製品を清浄度(ふき取り)検査および微生物測定の目的以外には使用しないでください。本製品は、微生物を特定する検査などにはご使用できません。
- ② 本製品は ATP 法を用いた迅速測定キットであり、本製品を用いて正確な一般生菌数を求めることはできません。一般生菌数を正確に測定する際は、食品衛生検査指針で定める測定法に従って測定してください。
- ③ 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。
- ④ 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。
- ⑤ 本製品の ATP 抽出試薬にはアルカリ性 (pH 12.0) の試薬を用いています。取扱いにはくれぐれもご注意ください。
- ⑥ 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：冷暗所にて 2~8°C で保存。
- 2) 試薬開栓後の保存：発光試薬および ATP 抽出試薬ともに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、発光試薬は冷蔵 (2~8°C) または凍結 (-10°C 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°C) で 1 週間、凍結 (-10°C 以下) で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。ATP 抽出試薬は、冷蔵 (2~8°C) で 1 ヶ月間の保存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。

製造元：

キッコー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/>

© 2011 Kikkoman Corp. 20120701