

「ルシフェール CT150」取扱説明書

商品コード:60263



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下さい。
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下さい

「ルシフェール CT150」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、大腸菌群検査用キットです。

【用途】

本製品は、環境衛生管理上の汚染指標菌である大腸菌群の陽性／陰性を迅速に判定することができます。

- ・ 既存の迅速検査法よりさらに迅速に判定できます(培地 2 mL 中に初発菌数が約 10 個存在した場合、最短 5.5 時間)。
- ・ 大腸菌群の陽性／陰性を判定します。菌数を定量することはできません。
- ・ 本製品は自主衛生検査用です。公定法ではありません。必要に応じて公定法を併用してください。

【測定原理】

本製品は、食品衛生検査指針に記載されている、酵素基質を用いた簡易・迅速検査法に基づいた大腸菌群検査キットです。すなわち、グラム陰性菌の選択培養を行った後に、大腸菌群の指標であるβ-ガラクトシダーゼの検出を行います。β-ガラクトシダーゼの検出は、その酵素反応の基質に D-ルシフェリン-O-β-ガラクトピラノシドを用い、その分解によって生じたルシフェリンをホタルルシフェラーゼで発光させることにより行います。ホタルルシフェラーゼによる発光反応は非常に高感度にルシフェリンを検出することができますので、従来法よりも短い培養時間で判定することができます。

【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。

名称	主成分	数量
検出試薬CT150	・D-ルシフェリン-O-β-ガラクトピラノシド ・ルシフェラーゼ ・ATP	凍結乾燥品 5本
検出試薬CT150溶解液	滅菌超純水	6.3 mL 5本
陽性対照CT150	β-ガラクトシダーゼ	2 mL 1本

本製品は 150 回測定用です。ブランク値の測定や試薬の性能確認にも検出試薬 CT150 を用いますので、それらの測定数を差し引いた数の試料数の測定ができます。

【使用上の注意】

本製品の性能を充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 使用時は検査用手袋やマスクなどを着用してください。素手で使用したり唾液が混入したりしますと、β-ガラクトシダーゼや微生物によって検出試薬 CT150 そのものの発光値および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。
- ② 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。
- ③ 手袋は抗静電性のもので(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してください。

- ④ 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。
- ⑤ 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)。
- ⑥ 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。
- ⑦ 必ず、推奨機器を用い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、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑧ 必ず、推奨培地をお使いください。推奨外の培地を使用すると、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑨ 溶解した検出試薬 CT150 はすぐにルミチューブに分注し、室温で 10 分間以上(8 時間以内)静置してから測定を開始してください。静置時間が不適当な場合、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑩ 一度の測定に複数容器分の検出試薬 CT150 を使用する際は、すべての検出試薬 CT150 を均一に混合してから使用してください。混合せずに使用しますと、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑪ 本製品は大腸菌群の生産するβ-ガラクトシダーゼを検出します。菌株により増殖速度およびβ-ガラクトシダーゼの生産量が異なりますので、菌数を定量することはできません。
- ⑫ 5～7 時間培養では検出できない大腸菌群菌株も存在します。培養時間を長くしますと(最長 24 時間)、より確実な結果が得られます。一晚培養を行いますと、従来寒天培地では検出されなかった大腸菌群菌株でもほとんどの場合検出が可能です。ただし寒天培地で検出される菌株でも、本製品では検出されにくい菌株もまれに存在します。

【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:キッコーマンパイクメファ(株))

【推奨する増菌用培地】

ルシフェール CT150 用培地または、Pro-media XM プロス(エルメックス社製)をご使用ください。

ルシフェール CT150 用培地の組成は[5.5 g / L Nutrient Broth No.2 (Oxoid), 0.078% トリプトン(Difco), 0.39% NaCl, 39 mM リン酸ナトリウム, 0.1% デオキシコロール酸ナトリウム(和光純薬), 0.1 mM IPTG(和光純薬), pH 7.3]です。調製後、培養用の容器に分注し、オートクレーブにより滅菌(121°C、15 分)してご使用ください。

Pro-media XM プロスはメーカーの指示に従ってお使いください。

〔検査の方法〕

1. 本製品以外に準備する機器等

- ・ 推奨培地
- ・ ルミテスター C シリーズ
- ・ ルミチューブ (商品コード: 60183)
- ・ ルミチューブ立て
- ・ インキュベーター
- ・ 容量可変 (10~100 μ L と 100~1000 μ L) ピペット
- ・ 容量可変ピペット用チップ
- ・ 検査用手袋
- ・ 消毒用アルコール
- ・ 廃液用容器 (小型のバケツ、ビーカー等)
- ・ 廃棄処理に必要な器具または試薬 (オートクレーブまたは殺菌剤)

2. サンプリングおよび選択増菌培養

1) 選択増菌用培地の準備

検体数に加えて、ブランク値測定に必要な数の選択増菌用培地を用意し、あらかじめ 35~37°C に加温しておきます。ブランク値測定に必要な培地の数は、ふき取りの場合は 1 つです。食品試料の場合は食品の種類の数だけ必要です。

2) サンプリング

① 洗浄後の箇所のふき取り

滅菌綿棒を無菌生理食塩水で湿らせ、洗浄後の調理器具などの表面をふき取ります。この際、綿棒が他の場所に触れないように注意します。綿棒を 2 mL 程度の選択増菌用培地に直接懸濁します。

② 汚れた箇所のふき取り

ふき取り箇所が食品残さ等で汚れている場合は、①のようにサンプリングしますとブランク値が高くなり測定できない場合がありますので、以下のようにサンプリングを行います。ふき取った後の綿棒を 1~10 mL 程度の緩衝液に懸濁します。0.2 mL 程度の懸濁液を 2 mL の培地に添加します。試料量を増やす場合は、試料量に対し 10 倍量程度の培地をお使いください。残りの懸濁液の一部 (添加量と同じ量) は「4. 測定操作 2) ブランク値測定」に使用しますので、測定まで冷蔵庫で保存します。

③ 食品試料など

液体試料はそのまま使用します。固体試料の場合はリン酸緩衝生理食塩水などで表面抽出またはストマッカーによる抽出を行います。試料や抽出液に対して 10 倍量~100 倍量の培地をお使いください (4. 測定操作 2) ブランク値の測定)。以下に主な食品での例を示します。牛乳 2.22 mL の場合は、Pro-media XM プロス 20 mL に添加します。冷凍食品の抽出試料液 0.2 mL (冷凍食品 0.02 g 分) の場合は、2 mL の CT 用培地または Pro-media XM プロスに添加します。汚れた箇所のふき取りと同様に、残りの試料 (または抽出液) の一部をブランク値測定時まで冷蔵庫で保存してください。複数の種類の食品について測定する場合は、種類ごとにブランク値を測定する必要があります。種類の数だけブランク値測定用の培地と試薬等が必要です。生鮮食品など β -ガラクトシダーゼを含む試料はブランク値が高くなり、測定困難となる場合が有ります。

3) 培養

35~37°C で 5~24 時間静置培養してください。検出に充

分な培養時間は被検微生物を考慮し、下表を参考にして決定してください。試料を加えていないブランク値測定用の培地も同時に静置培養してください。

表 大腸菌群の検出に必要な培養時間*

菌株	培養時間
<i>Escherichia coli</i> IAM12119	5 時間
<i>Citrobacter freundii</i> JCM1657	7 時間
<i>Enterobacter cloacae</i> IAM12349	6 時間

*培地 2 mL 当たりの初発菌数約 10 個

3. 測定準備

測定 30 分~1 時間前に、以下に示す方法で検出試薬 CT150 を調製し、測定準備を行ってください。試薬の性能確認を行いますので、試料数とブランク数の合計より 1 回多い測定分が必要です。1 本の検出試薬 CT150 で 30 回の測定ができます。

- 1) 溶解: 開栓した検出試薬 CT150 の 1 瓶に 1 瓶分の検出試薬 CT150 溶解液を全量移し入れ、泡立たない程度に攪拌して溶解してください。沈殿物を完全に溶かしてからお使いください。
- 2) 混合: 複数の検出試薬 CT150 を調製した場合は、清潔な容器*を準備し、混合してください。
* 充分洗浄し、 β -ガラクトシダーゼで汚染されていないもの。「5) 検出試薬 CT150 の性能確認」の ②で、測定値 1 が 800 RLU 以上だった場合、汚染の可能性があります。
- 3) 分注: 静置: 1 瓶分の溶解した検出試薬 CT150 を、容量可変ピペットを用いて 200 μ L ずつ合計 30 本のルミチューブに分注してください。すぐに使用する本数 (試料数とブランク数の合計より 1 本多い本数) を室温 (20~30 °C) で 10 分以上 (8 時間以内) 静置します。この操作により試薬のバックグラウンドが安定します。
- 4) 残りの試薬の保存方法: 8 時間以内に使用する場合は室温で保存できます。24 時間以内に使用する場合は冷蔵で保存します。1 週間以内に使用する場合は -20°C 以下の冷凍で保存可能です。冷凍保存した検出試薬 CT150 を一度融解した後は保存できません。保存中にルミチューブ内の試薬が汚染ないようにチューブ立てをポリエチレン袋などに入れて保存してください。いずれの場合も保存した検出試薬 CT150 を使用する際は、室温に戻してから、「5) 検出試薬 CT150 の性能確認」に進んでください。
- 5) 検出試薬 CT150 の性能確認: 検出試薬 CT150 の性能を確認するため、以下の操作を行います。

① ルミテスターのフタの内側を、消毒用アルコールなどでしめらせたペーパータオルなどでふき取ってください。フタの内側にルシフェリンが付着していると正確な測定ができません。ルミテスターにて ATP 測定試薬などのルシフェリンを含む試薬を使用している場合は特に念入りにふき取ってください。

② 検出試薬 CT150 の入ったルミチューブを 1 本とり、そのままルミテスターで発光量 (RLU: Relative Light Unit) を測定します (測定値 1)。測定値 1 は 800 RLU 未満になります。800 RLU 以上の場合は、静置時間が短い、または β -ガラクトシダーゼによる汚染が考えられます。

③ 検出試薬 CT150 の入ったルミチューブを取り出し、その中に容量可変ピペットで陽性対照 CT150 を 40 μ L 添加し、10~30 分間、室温~37 °C にて静置します。

④ ルミテスターで発光量を測定します (測定値 2)。測定値 2

が測定値1の40倍以上であることを確認します。40倍未満の場合、検出試薬 CT150 の汚染または劣化が考えられます。新たに検出試薬 CT150 を調製してください。

4. 測定操作

1) 培養液の添加と測定

所定の培養時間を経過した培養液から40 μ Lを容量可変ピペットで取り、検出試薬 CT150 の入ったルミチューブに加えます。十分に混合した後、35~37 $^{\circ}$ C(選択増菌培養の温度と同じ温度)にて20分間静置します。この操作で大腸菌群から溶出した β -ガラクトシダーゼが検出試薬 CT150 と反応し持続的な発光が起こります。静置後にルミテスターにて発光量を測定します。20分間以上静置した場合は溶出が更に進行し、発光値が徐々に上昇します。一方、ブランク値は時間が経過しても上昇しません。時間に余裕がある場合は20分間以上(40分間まで)静止した方がより明確な判定が出来ます。残りの培養液は再測定の場合に備えて35~37 $^{\circ}$ Cにて培養を続けることをお勧めします。(5. データの取扱い)。

2) ブランク値の測定

35~37 $^{\circ}$ Cで静置培養したブランク値測定用の培地についても、上記の操作を同様に行い、発光量を測定してください(測定値 3)。汚れた箇所のふき取りや食品試料の場合は、冷蔵庫で保存した試料のうち培養に用いたのと同量を、ブランク値測定用に35~37 $^{\circ}$ Cで静置培養した培地に加えた上で同様の操作を行ってください。この測定値はブランク値であり、陽性判定の基準値を求めるために重要な値です。ブランク値は、通常1,200 RLU(推奨機器基準)を越えることはありません。越えた場合は、操作中になんらかの汚染があった可能性があります。ただし、汚れた箇所のふき取りや食品試料(生鮮食品など)を加えた場合は、 β -ガラクトシダーゼの混在などにより、培地のみの場合に比べて高い値を示す場合が有ります。このような場合、試料に対する培地の量を多くすればブランク値が下がります。望ましくはブランク値が5,000 RLU未満になるように試料と培地の混合比を設定してください。ただし、培地の割合が多くなりますと試料が希釈される分だけ培養時間を長くする必要があります。

5. データの取扱い

ブランク値(測定値3)の2倍以上の発光量を示したものを陽性、1.5倍以上~2倍未満の発光量を示したものを疑陽性と判定します。また、1.5倍未満の発光量を示したものを陰性と判定します。疑陽性と判定された検体は、最初の測定から1時間程度後に残りの培養液(35~37 $^{\circ}$ Cで培養を継続)を再測定することをお勧めいたします。明確な結果が得られる場合があります。

【廃棄の方法】

培養済みの培地および測定チューブ内の微生物は、殺菌剤等で処理するか、オートクレーブ殺菌を行ってから廃棄してください。

試薬の容器はガラス、ゴム、アルミ、ポリエチレンの材質からなっています。ルミチューブはポリスチレン製です。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本製品の試薬類を口に入れたり、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。
- ②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、廃棄に十分ご注意ください。
- ③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 $^{\circ}$ C)にて保存。
- 2) 溶解後の検出試薬 CT150 の保存: 「3.測定準備 4) 残りの試薬の保存方法」に記載
- 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】

- Masuda-Nishimura, I. et al. (2000) Lett. Appl. Microbiol. 30, 130-135
 上門英明 他 (2003) 防菌防黴 31, 7-11
 上門英明 他 (2003) 防菌防黴 31, 183-190

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://www.kikkoman.co.jp/bio/>

© 2011 Kikkoman Corp. (2011041)