



キッコーマン ATP 消去用試薬キット

# 「ルシフェール ATP 消去試薬セット」取扱い説明書

商品コード: 60254



## 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。

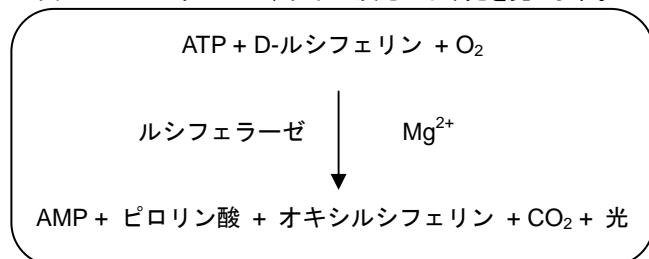
「ルシフェール ATP 消去試薬セット」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、測定試料中の ATP 消去用試薬キットです。

## 【用途】

本製品は、試料中に含まれる細胞外 ATP (アデノシン三リン酸) の消去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、培地などにも ATP が多量に含まれています (細胞外 ATP)。細胞あたりの ATP 量はほぼ一定なので、細胞外 ATP を消去した後、細胞内 ATP のみを測定することにより、生細胞数を推定することができます。本製品は細胞外 ATP の消去を目的として開発され、非常に効率よく細胞外 ATP の消去ができるように調製されています。なお、細胞内 ATP の抽出、測定には別売りのルシフェール 250 プラス (商品コード: 60312) およびルシフェール HS プラス (商品コード: 60313) をご使用下さい。

## 【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         |
|-------------|---------------------|------------|
| ATP 消去試薬    | ATP 分解酵素<br>MES 緩衝液 | 凍結乾燥品 5 本  |
| ATP 消去試薬溶解液 | MES 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、以下の点にご注意下さい。

- ①品質保持期限が切れた製品は使用しないで下さい。細胞外 ATP の消去が充分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発光測定をする場合、必ず推奨機器を用い発光量を測定して下さい。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。

- ③ATP 消去試薬は凍結乾燥後、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下さい。
- ④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下さい。微生物が混入すると試薬の性能が劣化し、細胞外 ATP の消去が充分に行えないおそれがあります。
- ⑤本製品の使用に際しては、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下さい。微生物が混入すると試薬の性能が劣化し、細胞外 ATP の消去が充分に行えないおそれがあります。
- ⑥ATP 消去試薬で処理した後に残存する細胞外 ATP 量は、試料の種類によって異なります。残存する細胞外 ATP 量は、「5) 測定例 ①例 1 細胞外 ATP の消去」で示した手順に従って測定して下さい。
- ⑦ATP 消去試薬で処理した後は 15 分以内に発光量を測定して下さい。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑧ATP 消去反応中は反応を行っているチューブをラップなどで覆ってください。ほこりや微生物が混入し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑨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 消去試薬で処理している間に ATP 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下さい。例えば、グルコースやショ糖など糖類の添加が有効です。
- ⑩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下さい。

## 【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】

ATP 消去試薬は凍結乾燥後、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下さい。開栓した ATP 消去試薬 1 瓶に 1 瓶分の ATP 消去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下さい。溶解した ATP 消去試薬は、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) して下さい。保存期間は、冷蔵で 1 週間、凍結で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度として下さい。

## 〔測定方法〕

- 1) 本製品の他に準備する器具および試薬  
ルシフェール 250 プラス(商品コード:60312)またはルシフェール HS プラス(商品コード:60313)、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
- 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試料中には細胞外 ATP と生細胞が混在しています。細胞外 ATP のみの量を調べるには、0.22  $\mu$  m のフィルターでろ過したものを測定試料として用いて下さい。
- 3) 細胞外 ATP の消去  
ルミチューブに試料 1.0 mL を採取します。そこに 0.1 mL の ATP 消去試薬を添加し、ミキサーなどで良く攪拌します。その 0.1 mL を別のルミチューブに採取し、良く攪拌後、ラップなどでチューブを覆って室温で 30 分間反応させます。
- 4) 発光測定  
ルシフェール 250 プラスの取扱説明書に準じて、発光量の測定を行います。反応終了後の測定チューブに 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(RLU: Relative Light Unit)の測定を開始します。
- 5) 測定例

### 例 1: 細胞外 ATP の消去

測定例として、各種培地中の細胞外 ATP 量を消去前後でルシフェール 250 プラスを用いて測定した結果を示します。ブレインハートインフュージョン(BHI)培地、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地、普通ブイオン(NB)培地およびチオグリコール酸培地Ⅱ(TGCⅡ)を培地使用法に従って調製し、測定試料として用いました(いずれも、栄研化学(株)製)。上記方法に従って細胞外 ATP 量を消去し、発光量を測定しました。結果を表 1 に示しました。

表 1 各種培地における ATP 消去実験結果

| 試料      | 発光量 (RLU) |         |
|---------|-----------|---------|
|         | 未処理       | ATP 消去後 |
| BHI 培地  | 221       | 32      |
| SCD 培地  | 2,044     | 18      |
| NB 培地   | 985       | 10      |
| TGCⅡ 培地 | 2,027     | 32      |

未処理の細胞外 ATP 量は培地の種類によって若干異なりますが、最も高い SCD 培地では 2,044 RLU もの発光量が得られました。これに対し、ATP 消去後の細胞外 ATP 量はいずれの培地においても 32 RLU 以下となりました。

### 例 2: 微生物測定

測定例としてルシフェール 250 プラスを用いた *E. coli* ATCC 25922 の検量線を図 1 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。これを測定試料とし、上記方法に従って培地中の細胞外 ATP を消去、発光量を測定しました。微生物数

(CFU: Colony Forming Units)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。両測定値の間には 10<sup>3</sup>CFU/mL 以上で良好な直線関係が認められました。

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下さい。

## 〔廃棄の方法〕

ATP 消去試薬および ATP 消去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下さい。

## 〔取扱い上の注意〕

本製品を安全にご使用いただくため、以下の点にご注意下さい。

- ① 本製品を微生物測定の目的以外には使用しないで下さい。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下さい。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、指示を受けて下さい。
- 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、廃棄に充分ご注意下さい。
- ④ 製品は幼児の手の届かないところに保管して下さい。

## 〔保存方法〕

- 1) キットの保存: 冷暗所(2~8°C)にて保存。
- 2) 試薬開栓後の保存: 本製品は開栓後、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は、冷蔵(2~8°C)または凍結(-10°C以下)して下さい。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 回を限度として下さい。
- 3) 使用期限: 本製品の外箱に記載。

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](mailto:biochemifa@mail.kikkoman.co.jp)

URL: <http://www.kikkoman.co.jp/bio/>

©2011 Kikkoman Corp. (20110411)