

「ルシフェール TF100」取扱い説明書



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。

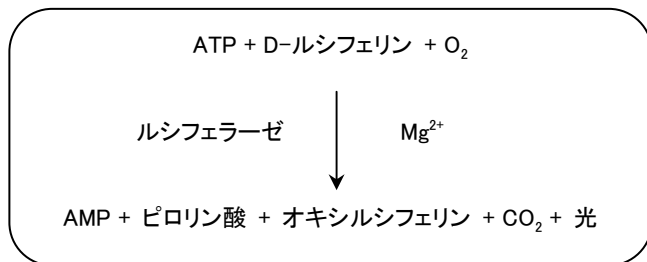
「ルシフェール TF」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、ホタルルシフェラーゼを用いた ATP(アデノシン三リン酸)法による茶飲料中微生物測定用の定性検査試薬キットです。

〔用途〕

本キットは茶飲料製品において、無菌であることを確認する検査に使用することができます。茶飲料製品を、フィルターを用いてろ過後、培養して一定濃度以上の菌濃度になったものに関して、迅速に菌混入の有無を確認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 を検出できます。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。また、生細胞中だけでなく、食品や食品残渣、そして本キットの測定対象である茶飲料製品にも遊離の ATP が多量に含まれています。

従来、茶飲料製品において無菌性を確認する手段として、製品を恒温状態に保持し、混入している微生物を増殖させた後、製品の一部を採取し、寒天培地を用いたプレート法により増殖菌の有無を確認してきました。しかし、混入する微生物は多種多様であり、茶飲料成分の影響の有無により、微生物の生育速度は大幅に異なります。そのため、茶飲料製品中での培養では、微生物を数日間で、プレート法による検出が可能な数まで増殖することは困難でした。また、プレート法ではコロニー形成をするまで数日間の培養期間を要し、検査に多くの日数を要していました。

本キットは、上記の問題を解決するために開発した試料処理方法と、ATP 消去試薬とを組み合わせたキットです。このキットは試料をフィルターろ過し、洗浄液を用いてろ過洗浄することで、茶飲料中に含まれる微生物生育阻害成分を除去し、混入した微生物の増殖を促進することができます。また、試料中の微生物以外の ATP を消去し、茶飲料成分や pH の影響を受けにくいように改良した ATP 抽出試薬 TF を用いることで、微生物由来の ATP を定性的に測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。

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 2本
発光試薬溶解液	Tricine 緩衝液	5.5 mL 2本
ATP 消去試薬	ATP 分解酵素	凍結乾燥品 2本
ATP 消去試薬溶解液	MES 緩衝液	5.5 mL 2本
希釈液	MES 緩衝液 糖類	105 mL 1本
洗浄液 TF (×25)	界面活性剤	210 mL 1本
ATP 抽出試薬 TF	界面活性剤	105 mL 2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。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、推奨機器を用い発光量を測定して下さい。推奨機器以外の測定機を使用しますと、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ③本製品は室温(20~30℃)に戻してからご使用下さい。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発光試薬および ATP 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。
- 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。
- ⑦使用時は検査用手袋などを着用して下さい。また、手袋は抗静电性のもので(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。
- 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、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下さい。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。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直ちに発光量の測定を開始して下さい。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下さい。
 - ⑬本キットは一般生菌の有無を定性的に判定する迅速検査キットです。正確な生菌数を測定するためには、食品衛生検査指針記載の手法に基づき、菌数を測定して下さい。
 - ⑭キット付属の試薬が ATP または微生物に汚染されていないことを必ず確認した後、試料を測定して下さい。汚染された試薬類を用いると、正確な測定が出来ない場合があります。
- * 汚染の確認は、**【測定方法】**・「1. 試薬汚染の確認方法」を参照の上行って下さい。

【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下さい。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下さい。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。

や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。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下さい。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回を限度として下さい。

2. ATP 消去試薬

ATP 消去試薬は、培地と希釈液に移し入れて使用します。

発光試薬と同様にして溶解し、液体培地 200 mL に対して溶解した消去試薬 1 瓶を移し入れます。培地は目的に応じて適宜選択してください(例:TSB 培地など)。移し入れる際には、滅菌シリンジと、滅菌フィルター(孔径:0.20~0.22 μm タイプ、滅菌済(Sterilized)のもの)を用いて、滅菌しながら注入して下さい。以下、これを「消去培地」と表記します。

希釈液へ入れる使い方は後述に従い実施してください。

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。や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。冷蔵(2~8℃)で1週間、凍結(-10℃以下)で1ヶ月間、凍結融解は3回を限度として下さい。

ATP 消去試薬を培地に入れた場合、やむを得ず保存する場合は室温で、希釈液に入れた場合は冷蔵(2~8℃)で保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、培地に入れた場合は2週間、希釈液に入れた場合は1ヶ月間保存できます。

3. ATP 抽出試薬 TF

開栓してそのままご使用下さい。一度で使い切ることをお勧めしますが、やむを得ず保存する場合は冷蔵(2~8℃)で保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、6ヶ月間保存できます。

4. 希釈液

希釈液は、ATP 消去試薬と混合してご使用下さい。開栓し

た希釈液 1 本に、1 瓶分の溶解した ATP 消去試薬をそのまま全量移し入れ、泡立たない程度に攪拌して混合して下さい。混合した溶液は以下「消去希釈液」と表記します。

消去希釈液は一度で使い切ることをお勧めしますが、やむを得ず保存する場合は冷蔵(2~8℃)で保存して下さい。

希釈液を開封後、消去試薬を混合せずに保存する場合は、凍結(-10℃以下)で保存して下さい。

ATP や微生物の汚染がない限り、消去希釈液は1ヶ月間、希釈液は6ヶ月間保存できます。

5. 洗浄液 TF (×25)

開栓後、オートクレーブ可能な容器に移し入れ、イオン交換水、蒸留水、超純水などを用いて 25 倍に希釈し、オートクレーブ(120℃、20分)をかけ、滅菌処理後にご使用ください。(例:洗浄液 TF (×25)を 20 mL に対して、480 mL のイオン交換水、蒸留水、超純水等で希釈する)

希釈した洗浄液は、一度で使い切ることをお勧めします。やむを得ず保存する場合は、希釈前の洗浄液(×25)は冷蔵(2~8℃)で、希釈した洗浄液は室温で保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、洗浄液 TF (×25)は6ヶ月間、希釈した洗浄液は1ヶ月間保存できます。

【測定方法】

本製品の他に準備する器具

フィルター(推奨:37mm モニターTF)、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(100 μL/1000 μL の設定ができるもの)、滅菌済みマイクロピペットチップ

1. 試薬汚染の確認方法

試薬開封時に以下の操作を行い、試薬ブランクの確認を行って下さい。

測定チューブを3本用意します。測定チューブに希釈液 0.9 mL、ATP 消去試薬 0.1 mL を採取し、ミキサーなどで数秒攪拌し、これを「消去希釈液」とします。2 本目の測定チューブに、ATP 抽出試薬 TF 液 0.1 mL を採取し、超純水 0.9 mL を加えミキサーなどで数秒攪拌し、これを「10 倍希釈抽出試薬」とします。3 本目のチューブに、消去希釈液 0.1 mL、10 倍希釈抽出試薬 0.1 mL を加えミキサーなどで数秒攪拌します。さらに 0.1 mL の発光試薬を添加し、ミキサーなどで数秒攪拌した上で、速やかにルミノメーターにて発光量の測定を開始します。

試薬開封時でブランク値は通常 50 RLU 以下の値を示します。開封済みの試薬を使用する場合も同様にブランク値を測定して下さい。ブランク値が 50 RLU 以上の値を示す場合は、以下の様に試薬を変えてブランク値を測定し、汚染された試薬を調査して下さい。

- ①消去試薬、希釈液を新しいものに替える。
- ②ATP 抽出試薬 TF を新しいものに替える。
- ③発光試薬を新しいものに替える。

新たな試薬に変更して発光量が減少したものが汚染された試薬です。汚染された試薬は後述の【廃棄の方法】に従い、廃棄して下さい。また、開封した試薬は前述の【試薬の調製法】に従い、保存して下さい。

2. 微生物測定

1) 測定試料の調製

一定の液量(100~500 mL 程度)をフィルターろ過します。25 倍に希釈し、オートクレーブをかけた洗浄液適量(~50 mL)を用いて、フィルターをろ過洗浄します。前述の「消去培地」を 2 mL 加え、適温で一定時間培養します。(例えば、細菌の検出を目的とした場合の培養温度、培養時間は、一般的に、30~37℃で 12~18 時間、真菌の場合、25~30℃で 24~48 時間がです。)

2)測定操作

測定前処理

- ・培養したフィルターに「消去希釈液」を 1 mL 添加
- ・フィルター上の残液を吸引により除去
- ・10 分間程度放置
- ・ATP 抽出試薬 TF 2 mL をフィルター上に添加
- ・抽出液を回収

発光量測定

- ・回収した抽出液 0.1 mL を新しいチューブに移す
- ・0.1 mL 発光試薬をチューブに添加

1～2 秒程攪拌し、ルミテスターにて速やかに発光量を測定

3)データの取扱い

ルミテスターは、相対発光量(Relative Light Unit:RLU)という単位で結果を表示します。ATP 法により得られる測定値(RLU)と従来のプレートによる培養法による一般生菌数の 2 つのデータを基準にして判定を行います(図)。製品の種類、菌の種類により測定値は変わりますので製品ごとにデータを取ることが必要になります。データを蓄積することによりブランク値(製品に含まれる消去しきれないATP由来の発光量)を求めることができます。無菌製品において無菌状態の確認としては、通常のブランク値より高い値が出た場合、微生物混入の可能性があると迅速に判断できます。

図. 緑茶 100 mL 中の微生物を検出、接種菌種: *Bacillus subtilis* (NBRC 13722)、ブランク値: 150～200 RLU

	添加菌数 (n=4)	30℃で培養後の発光量(RLU) (n=4)	
		12 時間	18 時間
芽胞添加なし	None	191	138
芽胞添加あり	1 個/試料	1355	44218

〔廃棄の方法〕

発光試薬および発光試薬溶解液、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。ATP 抽出試薬 TF および希釈液、洗浄液の容器は、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本キットは一般生菌の有無を定性的に判定する迅速検査キットです。正確な生菌数を測定するためには、食品衛生検査指針記載の手法に基づき、菌数を測定して下さい。
- 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。

- 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、廃棄に十分ご注意下さい。
- ⑤本製品の ATP 抽出試薬 TF にはアルカリ性(pH 10.8)の試薬を用いています。取扱いにはくれぐれもご注意下さい。
- ⑥本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: 冷暗所にて 2～8℃で保存。
- 2) 試薬開栓後の保存: 前述の〔試薬の調製法〕を参照して下さい。
- 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/>