

## 菌士郎® ATP 抗菌テスト Ver.2 (KKT2-100)

### 取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	2
III. 使用方法	3
IV. 参考データ	5
V. 使用上の注意	6

保存温度	<p style="text-align: center;"><b>-20°C</b></p> <p>&lt;構成品別の保存温度&gt; ATP 抽出試薬、発光試薬溶解液 : 4°C以下(-20°C可) ATP 発光試薬、ATP 標準試薬 : -20°C ※調製後の ATP 発光試薬:-80°C(遮光)</p>
使用期限	外箱に記載

## I. キットの概要

菌士郎® 抗菌テスト Ver.2 「KKT2-100」は、ATP 法を利用して、生菌数を迅速に測定する試薬キットです。ATP(アデノシン三リン酸)は、全ての生細胞に存在するエネルギー物質であり、ホタルルシフェリン・ルシフェラーゼと反応することにより発光を生じます。その発光量は ATP 量に比例するため、発光量を測定することにより、サンプル中の生菌数を推定することができます。

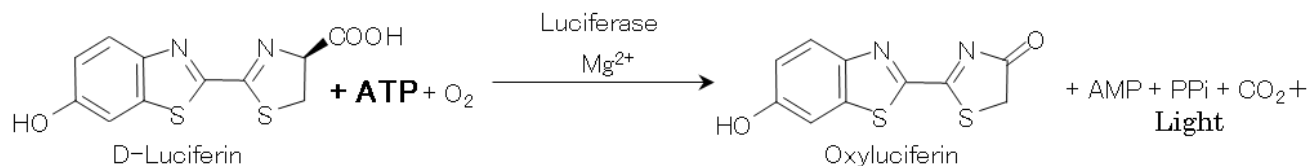


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

## II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
菌士郎® ATP 抗菌テスト Ver.2 (100 回用)	KKT2-100	・ATP 発光試薬 Ver.2 (凍結乾燥品) ・発光試薬溶解液 (12ml) ・ATP 抽出試薬 (62ml) ・ATP 標準試薬 (2 × 10 <sup>-9</sup> M、5ml)

### Ⅲ. 使用方法

☞ 試薬への ATP の混入を防ぐため、全操作に渡り、手袋およびマスクの着用をお勧めします。

試薬の準備	
ATP 発光 試薬の調製	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 発光試薬溶解液、ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)は温度による影響を受けます。24℃以上でのインキュベートや、長時間の室温での放置は避けて下さい。</li><li>2. ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)が入ったバイアル瓶のゴム栓をゆっくりと開け、発光試薬溶解液 12ml(全量)を添加して、再度ゴム栓を閉じます。 ☞ バイアル瓶内は陰圧状態です。開封時にパウダーが飛散しないよう、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てからゴム栓を外して下さい。</li><li>3. バイアル瓶をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。</li><li>4. バイアル瓶を室温で 1 時間静置し、試薬を馴染ませます。 ☞ ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)に発光試薬溶解液を加えて調製した“ATP 発光試薬(調製済)”は、<u>-80℃にて遮光保存</u>して下さい。</li></ol> <p>◆本試薬は、光や温度、物理的な刺激による影響を受けます。直射日光が当たる場所や蛍光灯の真下での作業、試薬融解時の 24℃以上でのインキュベートや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けて下さい。また、一度の測定で使い切らない場合は、凍結融解の繰り返しを避けるため、<u>必要量ずつ小分けにして-80℃で遮光保存</u>することをお勧めします。</p>
ATP 標準 試薬	☞ 一度の測定で使い切らない場合は、必要量ずつ小分けにし、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。

## <測定プロトコル>

①	指標菌の調製	<p>1. 液体培地に指標菌を接種し、菌液を調製します(10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup> cells/ml)。          ☞調製に使用する液体培地は、事前に培地そのものの発光量(ブランク値)を測定し、発光測定に支障がないことを確認して下さい。</p> <p><b>&lt;ブランク値の測定方法&gt;</b></p> <p>1. 液体培地 100 μl を測定用チューブに入れます。          2. ATP 抽出試薬 100 μl を添加します。          3. ATP 発光試薬(調整済)100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します(積算時間 10 秒)。  <u>※ブランク値が非常に高く、調製した指標菌(培地+指標菌)の発光量と同等である場合は、その培地を本測定系に使用することは出来ません。他の液体培地を使用して下さい。</u></p>
②	試験薬の添加	<p>2. 調製した菌液に、試験薬(評価対象となる抗菌剤)を添加します。          ☞比較対象として、コントロール群には同量の滅菌水を添加します。          ☞試験薬の添加量は、菌液の 1/50 以下の量に設定して下さい。</p>
③	ATP 抽出	<p>3. 一定時間毎に 2. の溶液 100 μl を測定用チューブに採取し、4~5 の操作を繰り返して発光量を測定します。          4. 室温に戻した ATP 抽出試薬 100 μl を添加し、10 秒間静置します。          ☞ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。氷中では、ATP の抽出が不十分となることがあります。</p>
④	発光測定	<p>5. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します(積算時間 10 秒)。          ☞ATP 発光試薬(調製済)を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。          ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p>
⑤	抗菌活性の評価	<p>6. コントロール群と試験薬群の発光量を比較し、抗菌剤の抗菌活性を評価します。          ☞真菌(特に糸状菌)を指標菌とする場合…          一定時間毎にサンプリングする方法では、指標菌を均一に採取できず、測定値がばらつくことがあります。そのような場合は、培地全量に対して 1/10 程度の ATP 抽出試薬を加え、5~10 分間室温に静置して培地全体の ATP を抽出した後、100 μl を測定チューブに採取し、発光量を測定して下さい。</p>

☞測定毎に、同濃度の ATP 溶液を用いて試薬の発光活性を確認することをお勧めします。  
 (5 ページ参照)

## <測定プロトコル> 発光試薬の活性確認（必要に応じて実施）

①	試薬の準備	1. ATP 標準試薬 ( $2 \times 10^{-9} \text{M}$ ) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
②	発光測定	2. ATP 標準試薬 100 $\mu\text{l}$ を測定用チューブに入れます。 3. 室温に戻した ATP 発光試薬 (調製済) 100 $\mu\text{l}$ を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。

## IV. 参考データ

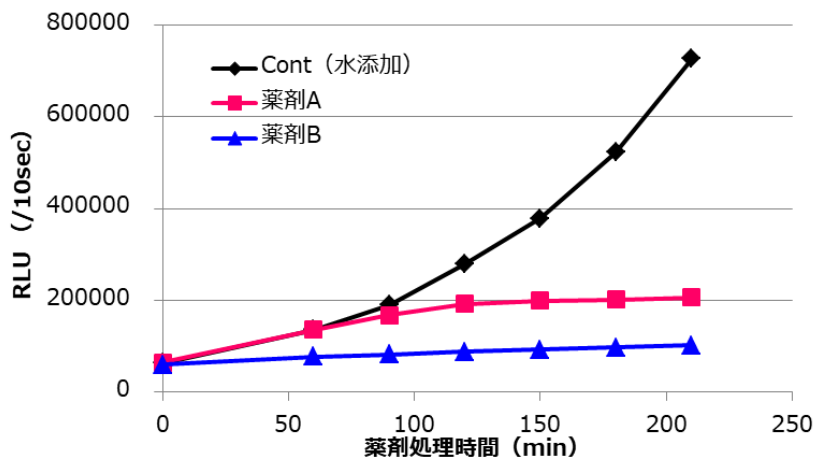


図 2. 試験薬による抗菌活性の確認（試験薬添加後、室温で静置した場合）  
菌液に薬剤 A または薬剤 B を添加後、室温で静置し、一定時間毎にプロトコルに従って生菌数（発光量）を測定した。  
（※RLU 実測値は、ルミノメーターの機種や菌種によって異なります）

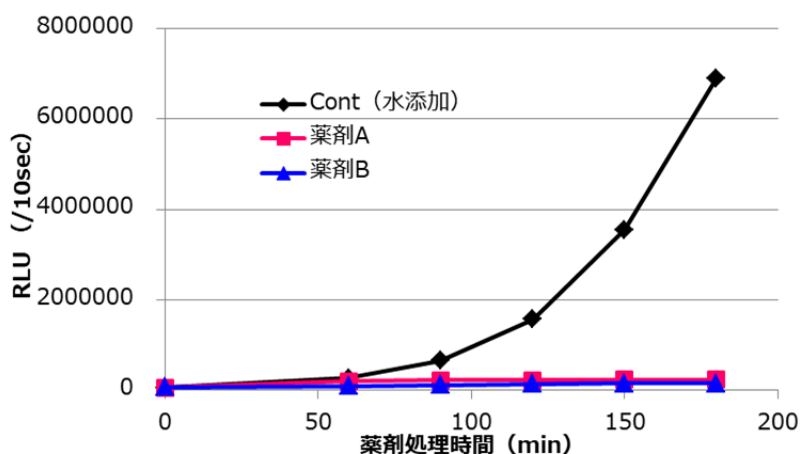


図 3. 試験薬による抗菌活性の確認（試験薬添加後、37°Cで振とう培養した場合）  
菌液に薬剤 A または薬剤 B を添加後、37°Cで振とう培養し、一定時間毎にプロトコルに従って生菌数（発光量）を測定した。

## V. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分して下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合があります。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- 手袋、保護メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けて下さい。試薬類が目に入った場合や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- その他、不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

問い合わせ先

東洋ビーネット株式会社  
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目2番1号  
E-mail: [b-net.bio@artiencegroup.com](mailto:b-net.bio@artiencegroup.com)  
HP: <https://artiencegroup.com>