

## 菌士郎® Bact-Collect ATP 発光キット (製品コード: LL100-BCHS)

### 取扱説明書

I.	キットの概要	2
II.	製品構成	3
III.	使用方法	3
IV.	参考データ	16
V.	トラブルシューティング	17
VI.	関連製品	18
VII.	使用上の注意	18

保存温度	<b>-20°C</b> (試薬 C、ATP 抽出試薬 : 4°C以下 冷蔵可)  ※調製後の ATP 発光試薬 3ヶ月以上保管する場合は、-80°C(遮光)保存
使用期限	外箱に記載

## I. キットの概要

菌士郎® Bact-Collect ATP 発光キット「LL100-BCHS」は、遠心操作により菌密度を高め、高感度に検体中の菌数(菌由来のATP(アデノシン三リン酸)量)を測定するキットです。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、検体中の生菌数を推定することができます。本キットによる測定では、培養時間が不要であり、最短10分<sup>※1</sup>で、5cfu/ml~<sup>※2</sup>(図1参照)という非常に高感度な検出が可能です。

※1 検体組成による(最長プロトコルの場合は50min)

※2 検体組成および菌種による

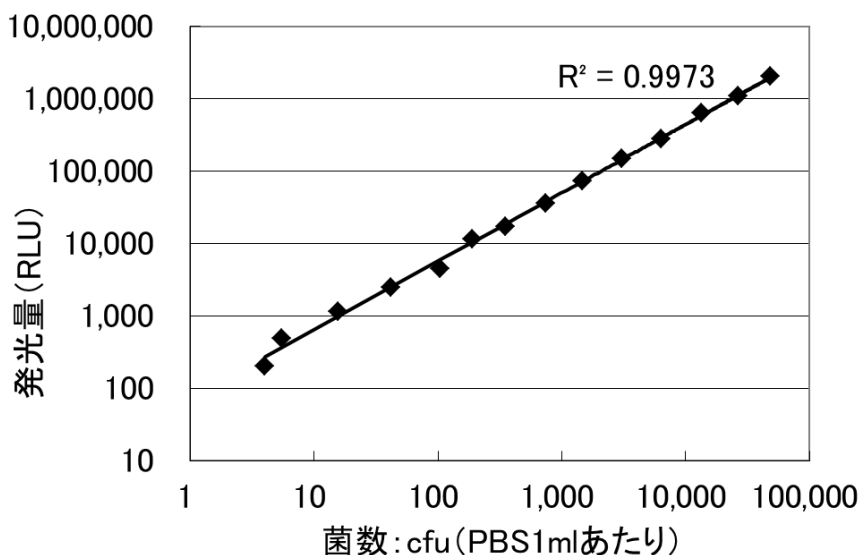


図1. リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の菌数と発光量の関係

また、本キットの使用により、

- ①塩濃度が高く、発光阻害を生じていた検体
- ②油脂を含む検体
- ③色や濁りのある検体(ex コーヒー)
- ④遊離ATPが多量に含まれている検体(ex 茶、果汁飲料、果物・野菜のスムージー)
- ⑤半固体状(乳化液状)の検体(ex マヨネーズ)
- ⑥化粧品(ex 化粧水)

など、これまで発光測定には不向きとされていた検体や、検出感度が不十分だった検体に対しても、高感度に菌数を推定することが可能です。

ホタル・ルシフェラーゼ発光反応は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化を通して光を生じる反応です。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)の存在下においてATPと反応した後、酸素(O<sub>2</sub>)と反応して励起状態のオキシルルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に光を発します(図2)。

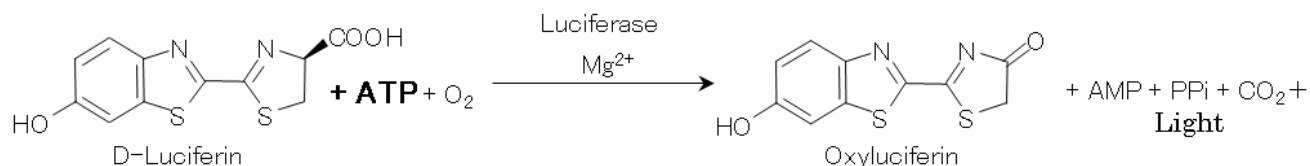


図2. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

## II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
菌士郎® Bact-Collect ATP 発光キット	LL100-BCHS	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ATP 発光試薬 BCHS(凍結乾燥品)</li> <li>・発光試薬溶解液 BCHS(12ml)</li> <li>・ATP 標準試薬 (2 × 10<sup>-9</sup>M, 5ml)</li> <li>・ATP 抽出試薬(12ml)</li> <li>・試薬 C(50ml)</li> </ul>

## 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。
- ☞ 検体の種類によっては、本キット以外に必要となるものがあります(4 ページ参照)。

### 試薬の準備 (全プロトコル共通)

ATP 発光 試薬の調製	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 発光試薬溶解液 BCHS、ATP 発光試薬 BCHS(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ ATP 発光試薬 BCHS(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 BCHS(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 BCHS 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 15 分静置し、試薬を完全に溶解させます。 ☞ ATP 発光試薬 BCHS(凍結乾燥品)に発光試薬溶解液 BCHS を加えて調製した “ATP 発光試薬(調製済)”は、-20℃にて遮光保存して下さい。 (※3 ヶ月以上保管する場合は、-80℃にて遮光保存)</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、-20℃(3 ヶ月以上保管する場合は-80℃)で遮光保存することをお勧めします。</u> (IV. 参考データを参照)</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。
試薬 C	☞ 転倒混和により混合し、均一に白濁したことを確認してから使用して下さい。 (転倒混和の目安 : ゆっくりと 10 回)

## <プロトコル選択ガイド>

菌数測定のプロトコルは、検体の特性により異なります。

下記表を参考に、プロトコルを選択して下さい。

	検体例	本キット以外に必要なもの
プロトコル A (5 ページ参照)	<p>①水、緩衝液、生理食塩水 など</p> <p>②化粧水</p> <p>③遊離 ATP や固形成分が含まれていない液体</p> <p>(ex 水、PBS、生理食塩水、化粧水)</p>	<p>・滅菌水</p>
プロトコル B (7 ページ参照)	<p><u>遊離 ATP が含まれていない半固体状(乳化液状)の検体</u></p> <p>※固形成分は含まれていない</p> <p>(ex マヨネーズ)</p>	<p>・滅菌水</p> <p>・滅菌 PBS</p>
プロトコル C (9 ページ参照)	<p><u>少量の遊離 ATP が含まれている検体</u></p> <p>※固形成分は含まれていない</p> <p>(ex コーヒー、スポーツ飲料、少量の果汁を含む液体)</p>	<p>・菌士郎® ATP 除去試薬 (メーカーコード: LL100-3)</p>
プロトコル D (11 ページ参照)	<p>①<u>遊離 ATP が多量に含まれている検体</u> ※固形成分は含まれていない</p> <p>②<u>プロトコル C で測定した結果、ブランク値が高く、検出感度が低かった検体</u> (遊離 ATP の除去が不十分だった検体)</p> <p>(ex ウーロン茶、紅茶などの発酵茶)</p>	<p>・菌士郎® Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬 (メーカーコード: LL100-3BC)</p> <p>・滅菌水</p>
プロトコル E (13 ページ参照)	<p><u>遊離 ATP が多量に含まれており、固形成分を含有する検体</u></p> <p>(ex 緑茶、果汁飲料、スムージー)</p>	<p>・菌士郎® Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬 (メーカーコード: LL100-3BC)</p> <p>・滅菌水</p> <p>・検体を濾過するための 10μm ナイロンフィルター (滅菌済)</p>

## <測定プロトコル A> 遊離 ATP が含まれていない検体(液体)の場合

①	前処理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 検体 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブ(滅菌済)に採取します。</li> <li>2. 室温に戻した試薬 C 500 <math>\mu</math>l を添加し、転倒混和(10 回)により混合します。</li> <li>3. 12,000 <math>\times</math> g で 5 分間、遠心分離します(室温)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 遠心後に白色の沈殿物が形成されていない場合は、遠心時間を 10 分に延長して下さい(最大 15 分まで延長可)。</li> </ul> </li> <li>4. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をアスピレーターで吸引除去します。</li> <li>5. ペレットが残ったチューブに滅菌水 50 <math>\mu</math>l を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> </ol>
②	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. 5.の溶液を測定用チューブに移します(全量: 50 <math>\mu</math>l)</li> <li>7. 室温に戻した ATP 抽出試薬 50 <math>\mu</math>l を添加し、軽く数回チューブを振って混和後、10 秒間静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。</li> <li>☞ ATP 抽出試薬の添加から次ステップ(発光試薬の添加)までの時間を統一して下さい。</li> </ul> </li> </ol>
③	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> <li>8. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 <math>\mu</math>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(積算時間 10 秒)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 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。</li> <li>ex) 発光試薬の添加から 3 秒後に測定を開始する</li> </ul> </li> </ol>
④	生菌数の推定	<ol style="list-style-type: none"> <li>9. 発光量(ATP 法による測定値)と生菌数(培養法によりカウントした菌数)から作成した検量線を用いて、検体中の生菌数を推定します。</li> </ol>

☞測定毎に、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(15 ページ下部参照)。

<検量線の例> ※RLU は、無菌検体を測定した場合の“空白値”を引いた数値

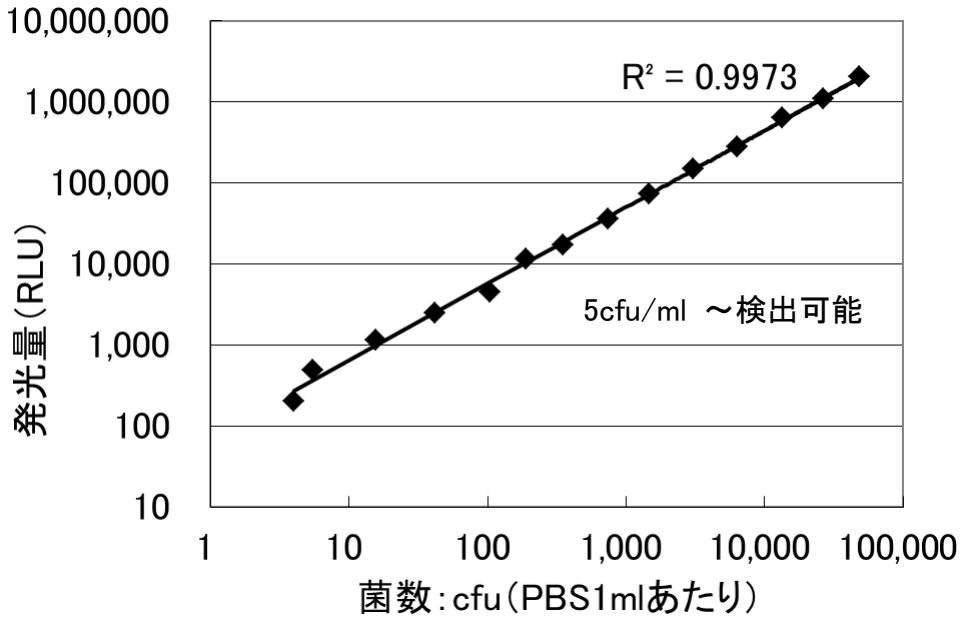


図 3. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の菌数と発光量の関係

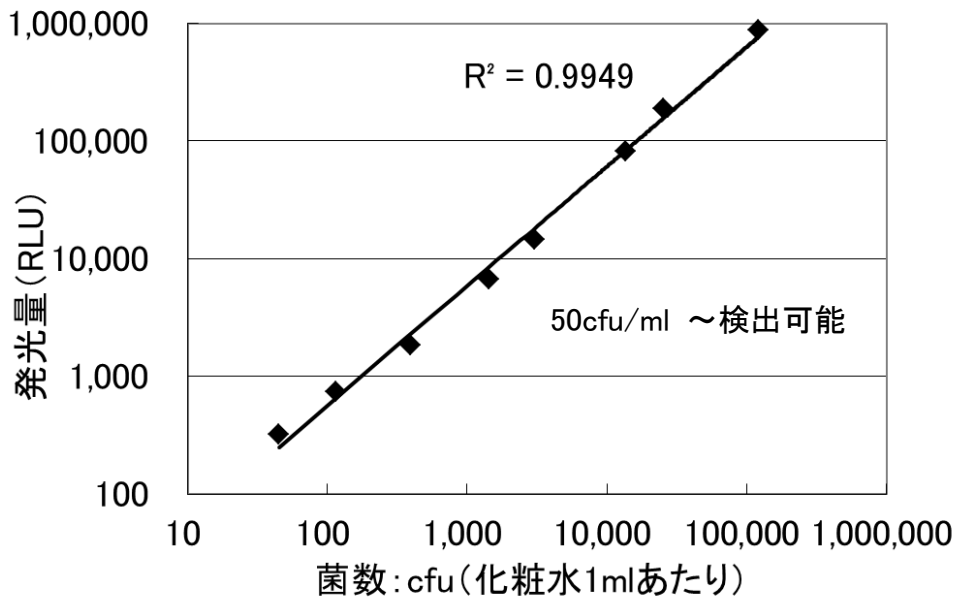


図 4. 化粧水中の菌数と発光量の関係

※プロトコル ステップ 3.の遠心時間は 10 分に延長

## <測定プロトコル B> 遊離 ATP が含まれていない検体(乳化液状)の場合

①	前処理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 検体 0.2 g を 1.5 ml 遠心チューブ(滅菌済)に採取し、PBS(滅菌済) 800 <math>\mu</math>l を添加します(混和不要)。</li> <li>2. 室温に戻した試薬 C 500 <math>\mu</math>l を添加し、転倒混和およびタッピングにより、完全に混合します。</li> <li>3. 12,000 <math>\times</math> g で 5 分間、遠心分離します(室温)。</li> <li>4. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をアスピレーターで吸引除去します。</li> <li>5. ペレットが残ったチューブに滅菌水 250 <math>\mu</math>l を添加し、ゆっくりとピペッティングして、ペレットを再分散させます。</li> </ol>
②	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. 5.の溶液 50 <math>\mu</math>l を測定用チューブに採取します。</li> <li>7. 室温に戻した ATP 抽出試薬 50 <math>\mu</math>l を添加し、軽く数回チューブを振って混和後、10 秒間静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。</li> <li>☞ ATP 抽出試薬の添加から次ステップ(発光試薬の添加)までの時間を統一して下さい。</li> </ul> </li> </ol>
③	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> <li>8. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済) 100 <math>\mu</math>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(積算時間 10 秒)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 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。</li> <li>ex) 発光試薬の添加から 3 秒後に測定を開始する</li> </ul> </li> </ol>
④	生菌数の推定	<ol style="list-style-type: none"> <li>9. 発光量(ATP 法による測定値)と生菌数(培養法によりカウントした菌数)から作成した検量線を用いて、検体中の生菌数を推定します。</li> </ol>

☞測定毎に、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(15 ページ下部参照)。

<検量線の例> ※RLU は、無菌検体を測定した場合の“ブランク値”を引いた数値

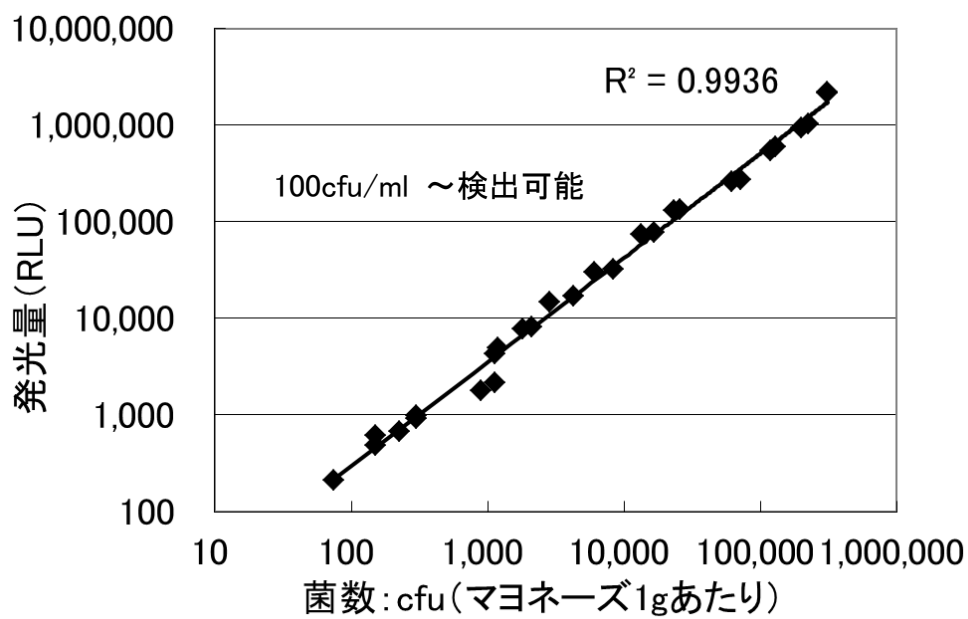


図 5. マヨネーズ中の菌数と発光量の関係



## <測定プロトコル C> 少量の遊離 ATP が含まれている検体の場合

①	前処理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 検体 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブ(滅菌済)に採取します。</li> <li>2. 室温に戻した試薬 C 500 <math>\mu</math>l を添加し、転倒混和(10 回)により混合します。</li> <li>3. 12,000 <math>\times</math> g で 5 分間、遠心分離します(室温)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 遠心後に白色の沈殿物が形成されていない場合は、遠心時間を 10 分に延長して下さい(最大 15 分まで延長可)。</li> </ul> </li> <li>4. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をアスピレーターで吸引除去します。</li> </ol>
②	遊離 ATP の分解	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. ペレットが残ったチューブに、別売の「菌士郎® ATP 除去試薬(メーカーコード : LL100-3)」50 <math>\mu</math>l を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> <li>6. 室温で 10~30 分間、静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 検体中の遊離 ATP 量により、必要な静置時間は変わります。予め、無菌検体を用いて、遊離 ATP の分解に要する時間を把握しておくことを推奨します。</li> </ul> </li> </ol>
③	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> <li>7. 6.の溶液を測定用チューブに移します(全量:50 <math>\mu</math>l)</li> <li>8. 室温に戻した ATP 抽出試薬 50 <math>\mu</math>l を添加し、軽く数回チューブを振って混和後、10 秒間静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。</li> <li>☞ ATP 抽出試薬の添加から次ステップ(発光試薬の添加)までの時間は、統一して下さい。</li> </ul> </li> </ol>
④	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> <li>9. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 <math>\mu</math>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(積算時間 10 秒)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 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。</li> <li>ex)発光試薬の添加から 3 秒後に測定を開始する</li> </ul> </li> </ol>
⑤	生菌数の推定	<ol style="list-style-type: none"> <li>10. 発光量(ATP 法による発光量の測定値)と生菌数(培養法による生菌数の測定値)から作成した検量線を用いて、検体中の生菌数を推定します。</li> </ol>

☞測定毎に、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(15 ページ下部参照)。

<検量線の例> ※RLU は、無菌検体を測定した場合の“空白値”を引いた数値

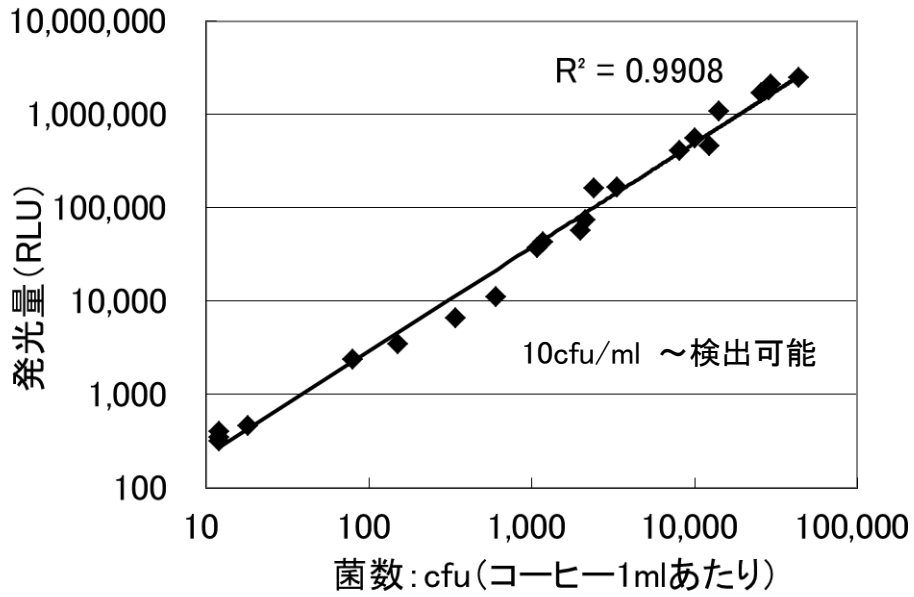


図 6. コーヒー中の菌数と発光量の関係  
 ※プロトコル ステップ 6.の静置時間は 10 分

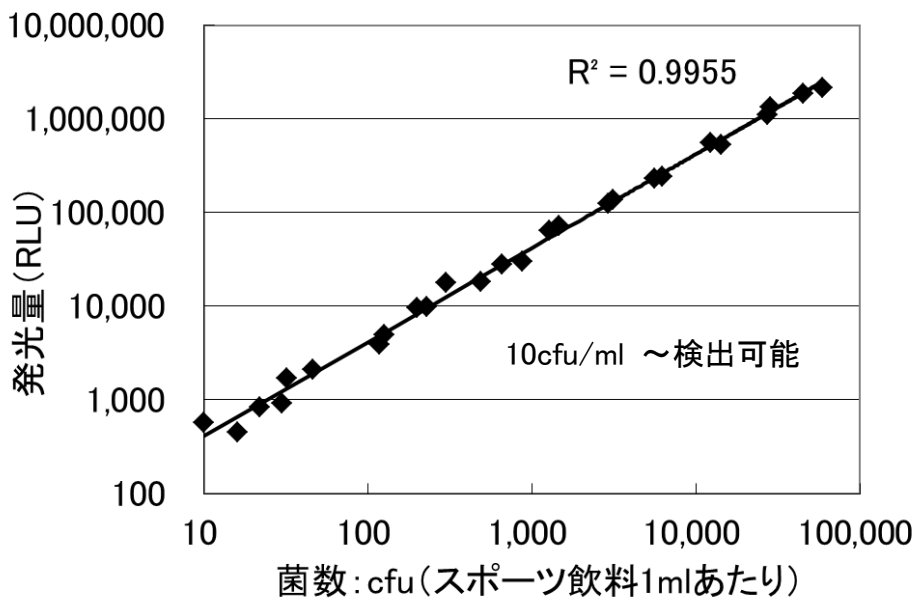


図 7. スポーツ飲料中の菌数と発光量の関係  
 ※プロトコル ステップ 3.の遠心時間は 10 分に延長  
 ※プロトコル ステップ 6.の静置時間は 30 分

＜測定プロトコル D＞ 遊離 ATP が多量に含まれている検体の場合  
(固形成分なし)

①	前処理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 検体 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブ(滅菌済)に採取します。</li> <li>2. 室温に戻した試薬 C 500 <math>\mu</math>l を添加し、転倒混和(10 回)により混合します。</li> <li>3. 12,000 <math>\times</math> g で 5 分間、遠心分離します(室温)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 遠心後に白色の沈殿物が形成されていない場合は、遠心時間を 10 分に延長して下さい(最大 15 分まで延長可)。</li> </ul> </li> <li>4. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をアスピレーターで吸引除去します。</li> </ol>
②	遊離 ATP の分解	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. ペレットが残ったチューブに、別売の「菌士郎® Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬(メーカーコード : LL100-3BC)」100 <math>\mu</math>l を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> <li>6. 30°C で 30 分間、静置します。</li> <li>7. 12,000 <math>\times</math> g で 10 分間、遠心分離します(室温)。</li> <li>8. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をピペットで吸引除去します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 沈殿物を吸引しないよう、ゆっくりと丁寧に除去して下さい。</li> </ul> </li> <li>9. ペレットが残ったチューブに滅菌水 50 <math>\mu</math>l を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> </ol>
③	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> <li>10. 9.の溶液を測定用チューブに移します(全量: 50 <math>\mu</math>l)</li> <li>11. 室温に戻した ATP 抽出試薬 50 <math>\mu</math>l を添加し、軽く数回チューブを振って混和後、10 秒間静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。</li> <li>☞ ATP 抽出試薬の添加から次ステップ(発光試薬の添加)までの時間は、統一して下さい。</li> </ul> </li> </ol>
④	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> <li>12. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 <math>\mu</math>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(積算時間 10 秒)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 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。</li> <li>ex) 発光試薬の添加から 3 秒後に測定を開始する</li> </ul> </li> </ol>
⑤	〔生菌数の推定〕	<ol style="list-style-type: none"> <li>13. 発光量(ATP 法による発光量の測定値)と生菌数(培養法による生菌数の測定値)から作成した検量線を用いて、検体中の生菌数を推定します。</li> </ol>

☞ 測定毎に、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(15 ページ下部参照)。

<検量線の例> ※RLU は、無菌検体を測定した場合の“空白値”を引いた数値

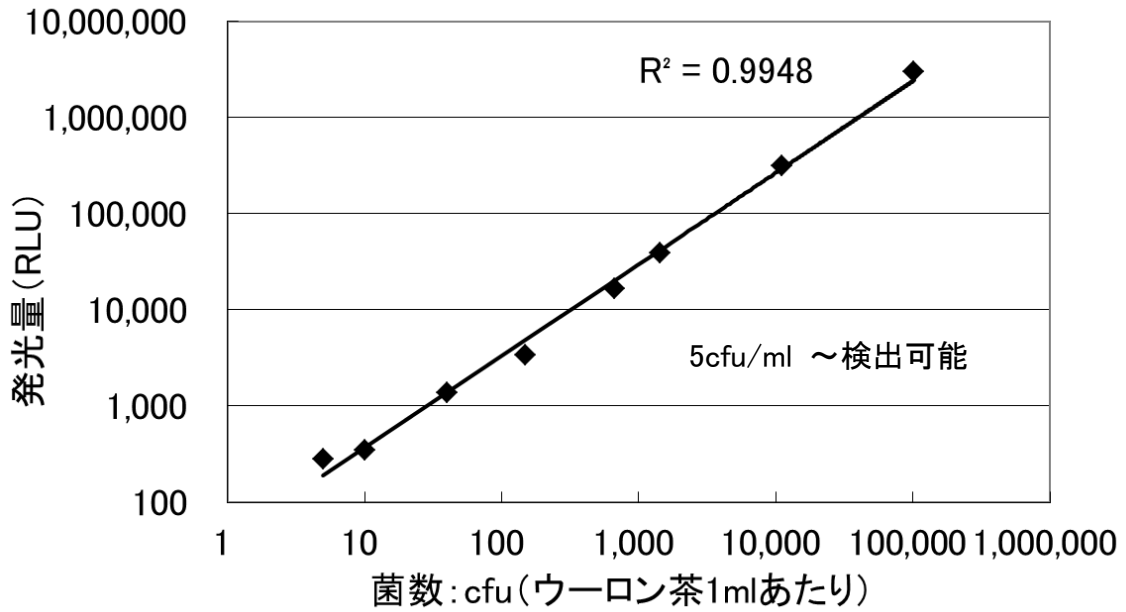


図 8. ウーロン茶中の菌数と発光量の関係

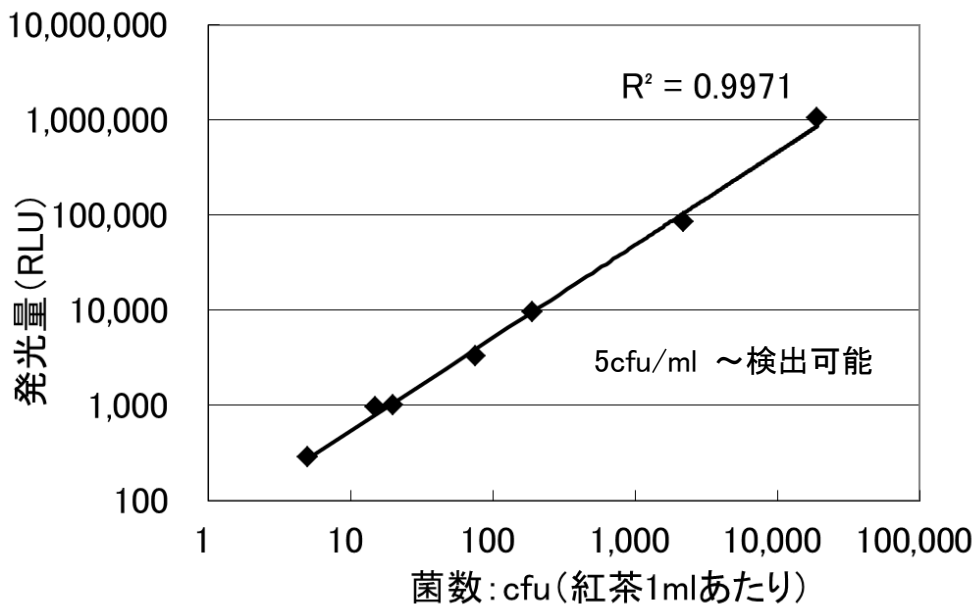


図 9. 紅茶中の菌数と発光量の関係

※プロトコル ステップ 3.の遠心時間は 10 分に延長

<測定プロトコル E> 遊離 ATP が多量に含まれており、固形成分を含有する検体

①	前処理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 検体 2 ml を 10 <math>\mu\text{m}</math> のナイロンフィルター(滅菌済)で濾過します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 固形成分の粒子サイズによっては、100 <math>\mu\text{m}</math>+10 <math>\mu\text{m}</math> のように多段階で処理することを推奨します(検体組成による)。</li> <li>ex) 緑茶、100%オレンジジュース 10<math>\mu\text{m}</math> のみ トマトジュース、スムージー 100 <math>\mu\text{m}</math>+10 <math>\mu\text{m}</math>(2 段階)</li> <li>☞ セルストレーナーを使用すると、簡便にフィルター処理できます。</li> </ul> </li> <li>2. 1.の溶液 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブ(滅菌済)に採取します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 10 <math>\mu\text{m}</math> のフィルターを通して多量の固形成分が残る検体の場合は、<u>1.の溶液 100 <math>\mu\text{l}</math> を 1.5 ml 遠心チューブに採取し、滅菌水 900 <math>\mu\text{l}</math> を添加</u>して下さい。</li> <li>ex) オレンジジュース、トマトジュース、スムージーなど (緑茶は、通常プロトコルの 1ml 採取で測定可能)</li> </ul> </li> <li>3. 室温に戻した試薬 C 500 <math>\mu\text{l}</math> を添加し、転倒混和(10 回)により混合します。</li> <li>4. 12,000 <math>\times g</math> で 5 分間、遠心分離します(室温)。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 遠心後に白色の沈殿物が形成されていない場合は、遠心時間を 10 分に延長して下さい(最大 15 分まで延長可)。</li> </ul> </li> <li>5. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をアスピレーターで吸引除去します。</li> </ol>
②	遊離 ATP の分解	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. ペレットが残ったチューブに、別売の「菌士郎® Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬(メーカーコード : LL100-3BC)」100 <math>\mu\text{l}</math> を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> <li>7. 30<math>^{\circ}\text{C}</math> で 30 分間、静置します。</li> <li>8. 12,000 <math>\times g</math> で 10 分間、遠心分離します(室温)。</li> <li>9. チューブの底に出来たペレット(白色沈殿物)を壊さないように注意しながら、上清をピペットで吸引除去します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 沈殿物を吸引しないよう、ゆっくりと丁寧に除去して下さい。</li> </ul> </li> <li>10. ペレットが残ったチューブに滅菌水 50 <math>\mu\text{l}</math> を添加し、ゆっくりとピペティングして、ペレットを再分散させます。</li> </ol>
③	ATP 抽出	<ol style="list-style-type: none"> <li>11. 10.の溶液を測定用チューブに移します(全量:50 <math>\mu\text{l}</math>)</li> <li>12. 室温に戻した ATP 抽出試薬 50 <math>\mu\text{l}</math> を添加し、軽く数回チューブを振って混和後、10 秒間静置します。 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。</li> <li>☞ ATP 抽出試薬の添加から次ステップ(発光試薬の添加)までの時間は、統一して下さい。</li> </ul> </li> </ol>

④	発光測定	<p>13. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 <math>\mu</math>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(積算時間 10 秒)。</p> <p>☞ 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。</p> <p>ex) 発光試薬の添加から 3 秒後に測定を開始する</p>
⑤	生菌数の推定	<p>14. 発光量(ATP 法による発光量の測定値)と生菌数(培養法による生菌数の測定値)から作成した検量線を用いて、検体中の生菌数を推定します。</p>

☞測定毎に、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(15 ページ下部参照)。

<検量線の例> ※RLU は、無菌検体を測定した場合の“ブランク値”を引いた数値

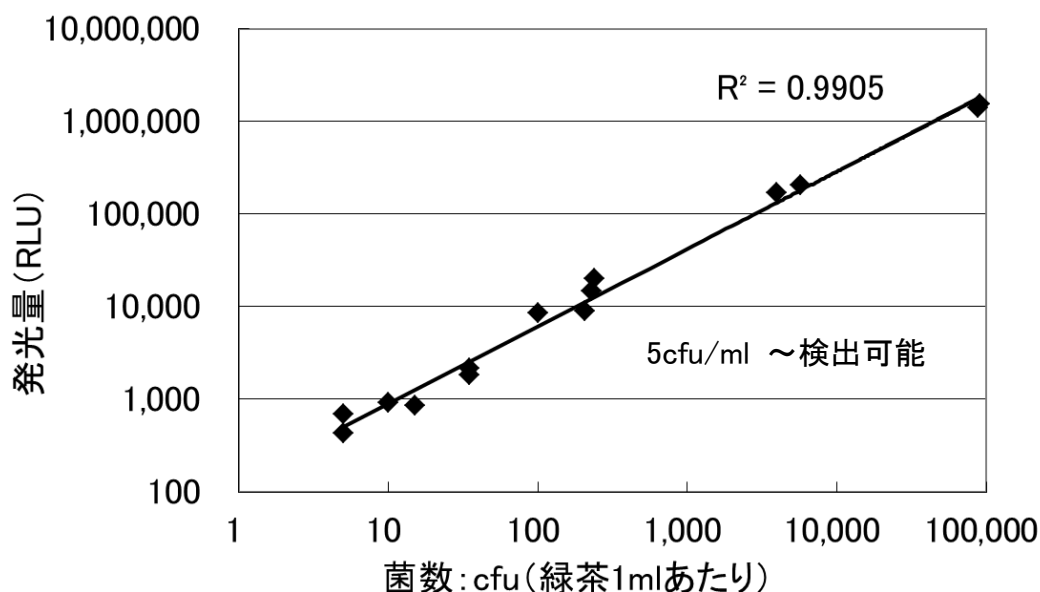


図 10. 緑茶中の菌数と発光量の関係

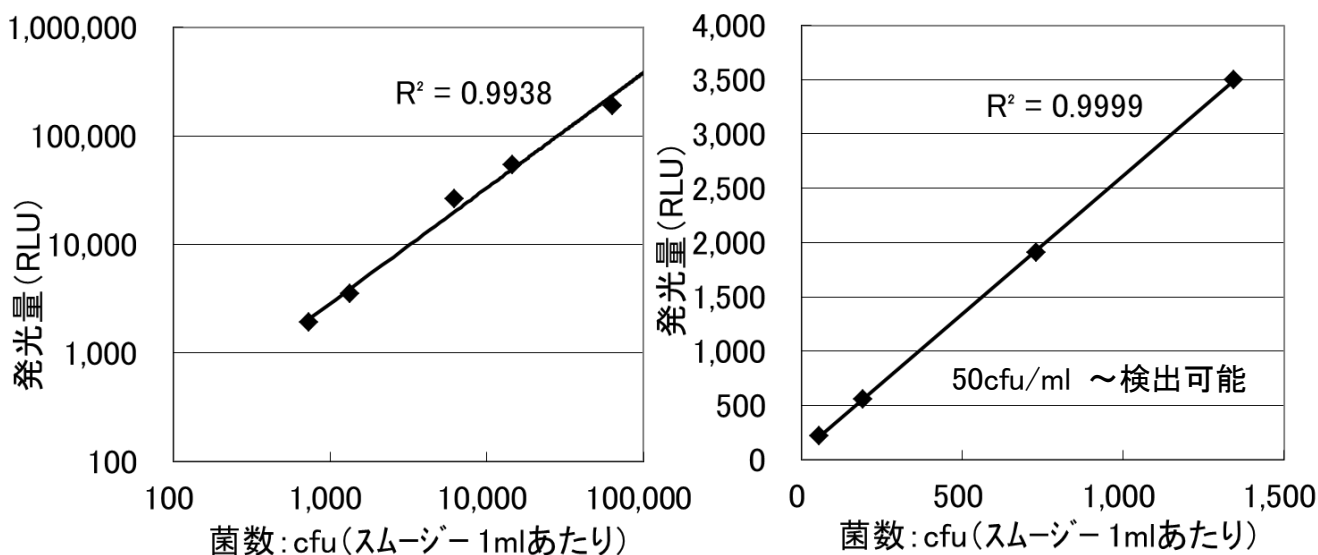


図 11. 野菜&果実のスムージー中の菌数と発光量の関係

※プロトコル ステップ 2.は、「1.の溶液 100 $\mu$ l+滅菌水 900 $\mu$ l」の方法で選択

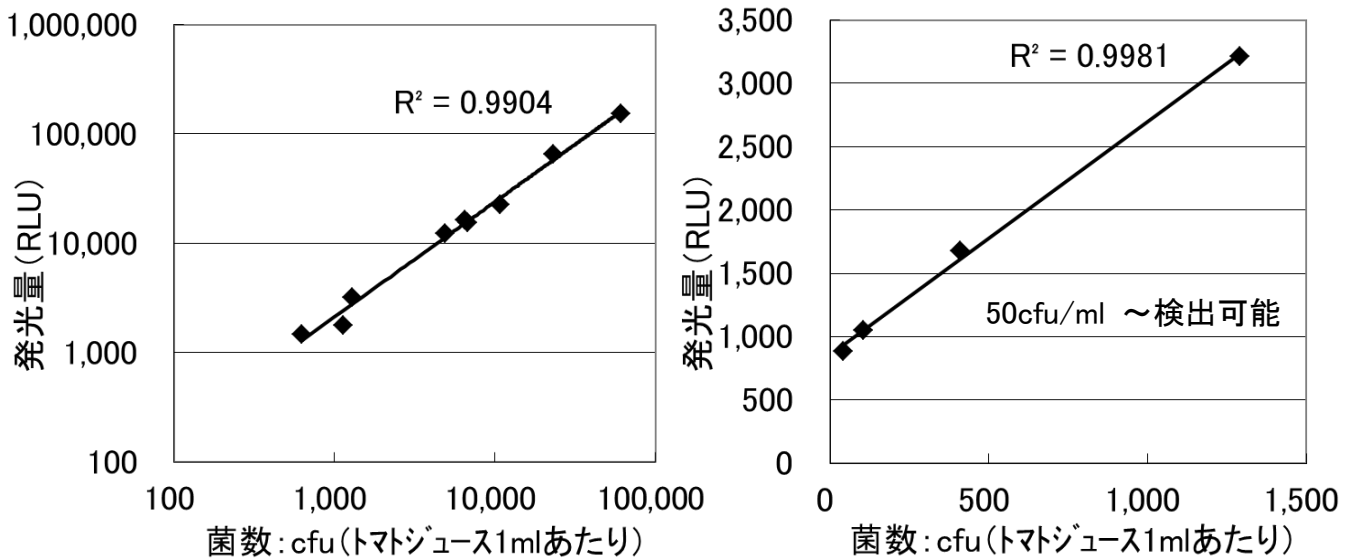


図 12. トマトジュース中の菌数と発光量の関係

※プロトコル ステップ 2.は、「1.の溶液 100 $\mu$ l+滅菌水 900 $\mu$ l」の方法を選択

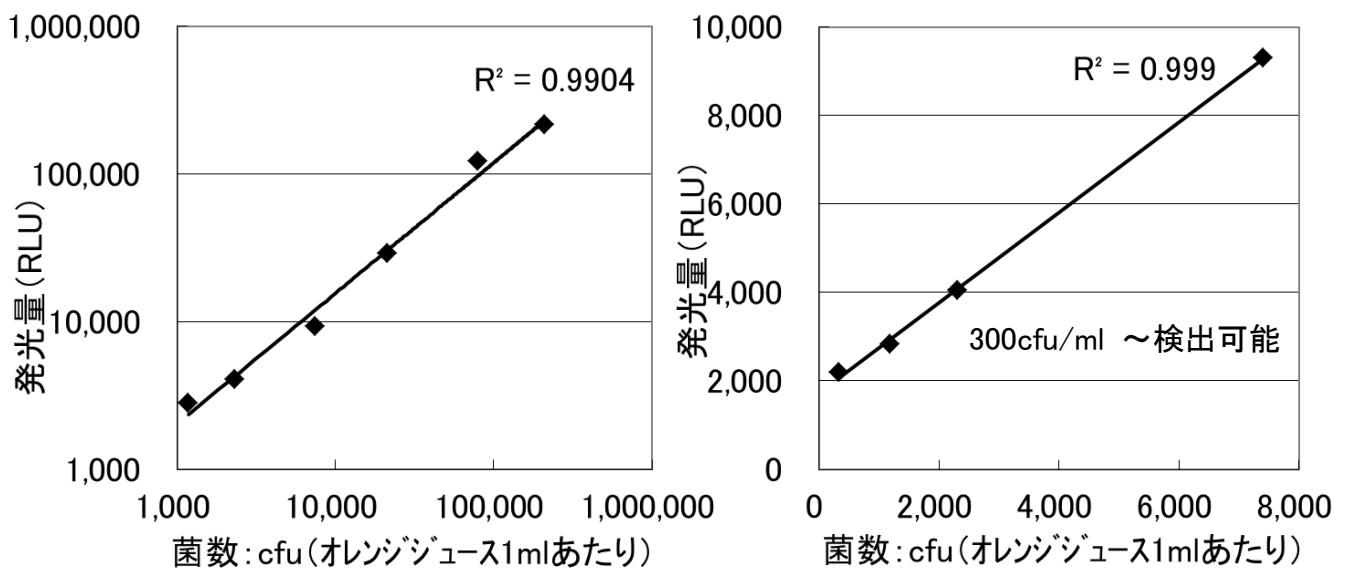


図 13. 100%オレンジジュース中の菌数と発光量の関係

※プロトコル ステップ 2.は、「1.の溶液 100 $\mu$ l+滅菌水 900 $\mu$ l」の方法を選択

※発光試薬の活性確認 (必要に応じて実施)

※全プロトコル共通

①	試薬の準備	1. ATP 標準試薬 ( $2 \times 10^{-9}$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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

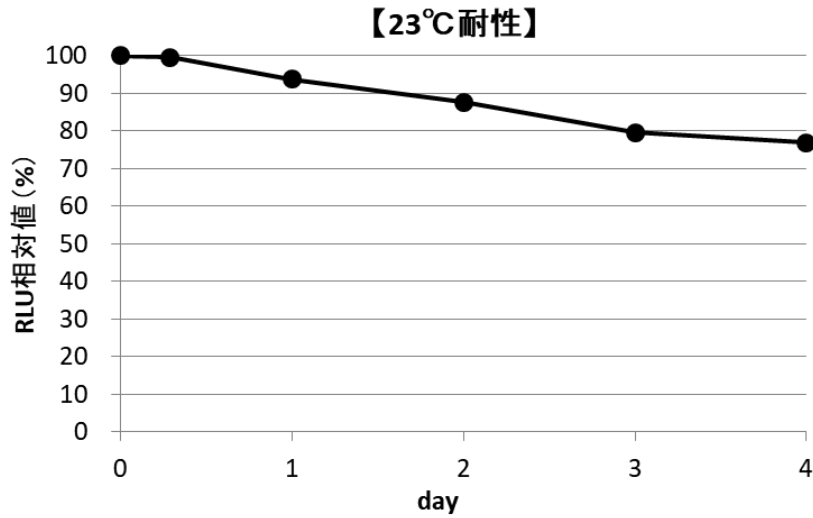


図 14. ATP 発光試薬(調製後)の室温耐性(23°Cのデータ)

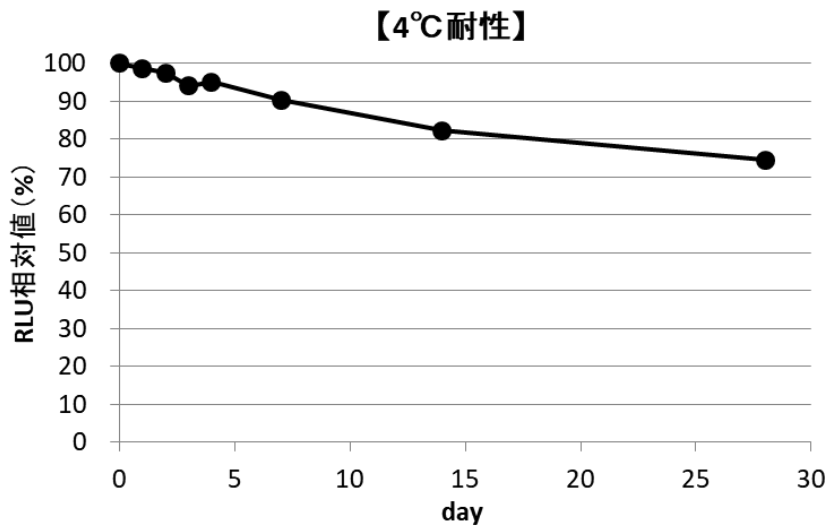


図 15. ATP 発光試薬(調製後)の冷蔵耐性(4°Cのデータ)

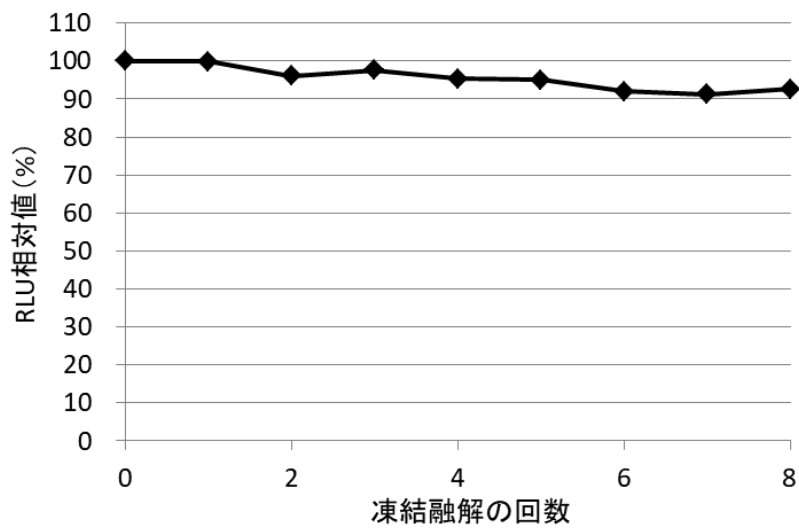


図 16. ATP 発光試薬(調製後)に対する凍結融解の影響



## V. トラブルシューティング

問題	原因	解決法
発光しない。 発光量が低い。	試薬が劣化している。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 保存状態により、試薬が劣化している可能性があります。試薬の保存方法を確認して下さい(1 ページ参照)。</li> <li>● ATP 標準試薬を用いて、ATP 発光試薬(調製済)の活性確認を行って下さい(15 ページ参照)。</li> </ul>
	ATP 発光試薬(調整済)が室温に戻っていない。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。ATP 発光試薬(調製済)が室温に戻っていることを確認して下さい。</li> </ul>
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が短い。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 測定感度はルミノメーターに依存します。1 検体あたりの測定時間(積算時間)を長く設定して下さい。</li> </ul>
発光量が高く、ルミノメーターの測定可能範囲を超えている。	検体中の菌数が多い。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 事前に、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認して下さい。</li> <li>● 検体を PBS または滅菌水で希釈して下さい。</li> </ul>
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が長い。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1 検体あたりの測定時間(積算時間)を短く設定して下さい。</li> </ul>
測定値のばらつきが大きい。	発光試薬の添加から測定を開始するまでの時間が異なる。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を各検体で統一して下さい。</li> </ul>
	ATP 抽出試薬の添加から発光試薬を添加するまでの時間が異なる。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ATP 抽出試薬の添加から発光測定までの時間は統一して下さい。</li> </ul>
	遠心後の吸引除去操作が上手く出来ていない。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ペレットを吸引しないよう、丁寧に上清を除去して下さい。</li> <li>● 上清が残らないよう、ペレットのみをチューブに残して下さい。</li> <li>● ペレットは崩れやすいため、遠心後は直ちに吸引操作を実施して下さい。遠心後のチューブを持ち運ぶ際は、チューブを揺らさないよう注意して下さい。</li> </ul>
	融解後の試薬成分が十分に混ざっていない。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 融解後の試薬は十分に混合してから使用して下さい。その際、ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避け、転倒混和等により穏やかに攪拌して下さい。</li> </ul>

## VI. 関連製品

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
菌士郎® ATP 除去試薬	LL100-3	ATP 抽出試薬 (12ml)	-20°C
菌士郎® Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬	LL100-3BC	Bact-Collect 専用 ATP 除去試薬 (12ml)	-20°C
菌士郎® 牛乳テスト Ver.2	KG2-100	・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 (12ml) ・ATP 標準試薬 ( $2 \times 10^{-9}$ M、5ml) ・試薬 A (55ml) ・試薬 B (12ml)	-20°C

## VII. 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  
HP: <https://artiencegroup.com>