

Extracellular ATP 測定キット (EX2-100)

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	6
V. トラブルシューティング	7
VI. 関連製品	7
VII. 使用上の注意	8

保存温度	<p>-20°C</p> <p>※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)</p>
使用期限	外箱に記載

I. キットの概要

Extracellular ATP 測定キット「EX2-100」は、培地中に放出された細胞外 ATP(アデノシン三リン酸)を高感度に発光測定する試薬キットです。発光試薬を添加するだけの 1 ステップで、簡便に細胞外 ATP 量を測定できます。

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^{2+})の存在下において ATP と反応した後、酸素(O_2)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)。

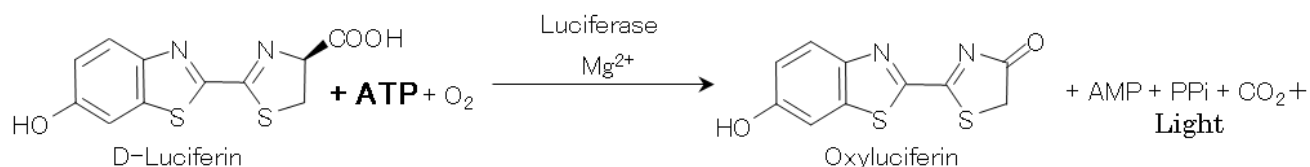


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
Extracellular ATP 測定キット	EX2-100	・EX-ATP 発光試薬(凍結乾燥品) ・EX-発光試薬溶解液(12ml) ・ATP 標準試薬($1 \times 10^{-3}M$, 1ml)

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">EX-発光試薬溶解液、EX-ATP 発光試薬(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ EX-ATP 発光試薬(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。EX-ATP 発光試薬(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、EX-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。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。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。 ☞ EX-ATP 発光試薬(凍結乾燥品)に EX-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℃にて遮光保存して下さい。</u> <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。

添加薬剤等によるルシフェラーゼ発光反応の阻害確認

(薬剤等による発光阻害の有無が不明な場合などに、必要に応じて実施)

使用予定の
添加薬剤が
発光反応を
阻害しないか
どうかの
確認

1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-9} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
2. 使用予定の薬剤等を添加した培地を用いて、ATP 標準試薬を 10,000 倍希釈し、“ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の ATP 溶液 (薬剤+ ver)” を調製します。
3. 2と同様の操作を薬剤無添加の培地で行い、“ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の ATP 溶液 (薬剤- ver)” を調製します。
4. 測定用チューブ 2 本に、2.または 3.で調製した ATP 溶液 100 μl を移します。
 - ☞ チューブ 1 : $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の ATP 溶液 (薬剤+ ver)
 - チューブ 2 : $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の ATP 溶液 (滅菌- ver)
5. 各チューブに、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。
 - ☞ 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 3 秒後に測定を開始する

◆チューブ 1 および 2 の発光量の差異を比較し、発光阻害の程度を確認します。

<測定プロトコル> 細胞外 ATP 量の測定

①	発光測定	<ol style="list-style-type: none">1. 検体(培地) 100 μl を測定用チューブに入れます。<ul style="list-style-type: none">☞ 使用した添加薬剤等がルシフェラーゼ発光反応を阻害しないかどうかの確認は、“ルシフェラーゼ発光反応の阻害確認(4 ページ上段)” を参照して下さい。2. 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。<ul style="list-style-type: none">☞ 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 3 秒後に測定を開始する
②	ATP 量の算出	<ol style="list-style-type: none">3. ATP 濃度と発光量から作成した検量線(5 ページ参照)を用いて、検体中の ATP 量を算出します。

☞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。

<測定プロトコル> ATP 標準試薬を用いた検量線の作成

①	試薬の準備	1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
②	希釈系列の調製	2. 検体測定時と同組成の培地を用いて、ATP 標準試薬の 10 倍希釈系列 ($10^{-7} \sim 10^{-12} \text{M}$) または 2 倍希釈系列を調製します。 ☞ 検体中の ATP 濃度を精度高く算出する場合は、10 倍希釈系列の ATP 溶液で作成した検量線によりおおよその ATP 濃度を把握した後、2 倍希釈系列の ATP 溶液を用いて検量線を作成することをお勧めします。 3. 2. で調製した各濃度の ATP 溶液 100 μl を各々測定用チューブに入れます。
③	発光測定	4. 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。
④	検量線の作成	5. ATP 濃度と発光量の対数グラフ (または相関グラフ) を作成します。

<参考データ>

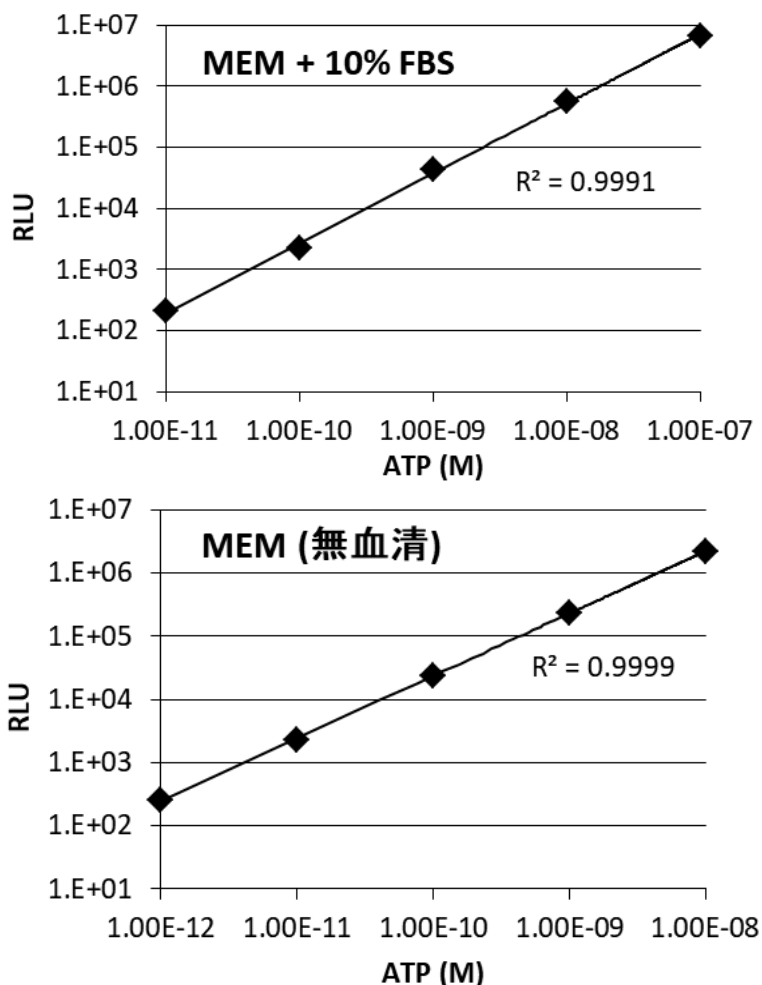


図 2. ATP 濃度と発光量の関係 (例)

IV. 参考データ

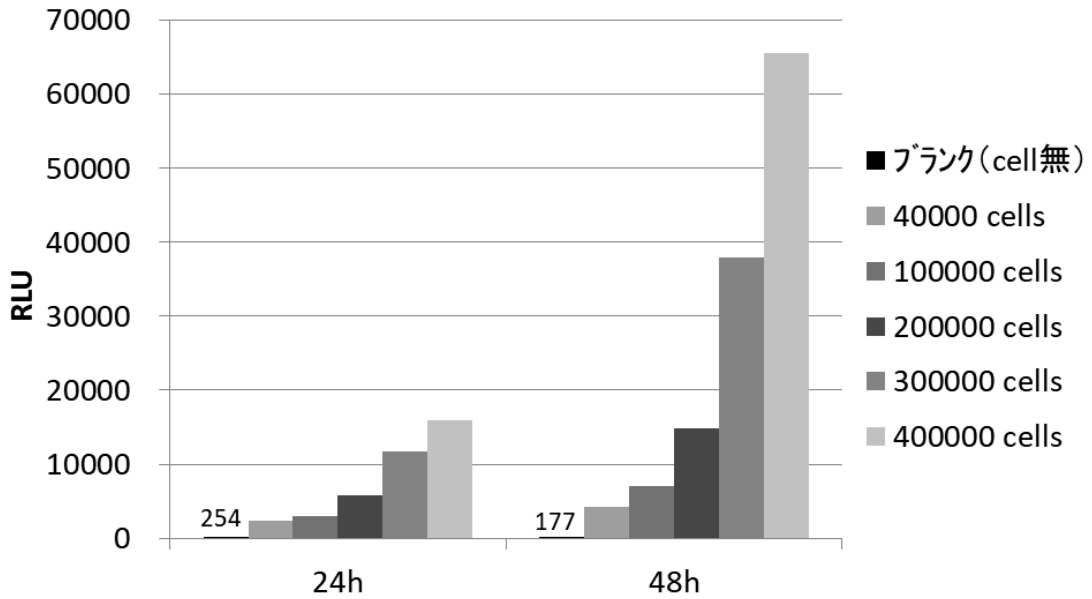


図 3. 細胞外 ATP の測定例

HeLa 細胞を 6well plate に播種し(播種数はグラフ凡例を参照)、24 時間後、48 時間後に培地を回収して、プロトコルに従い発光量を測定した。

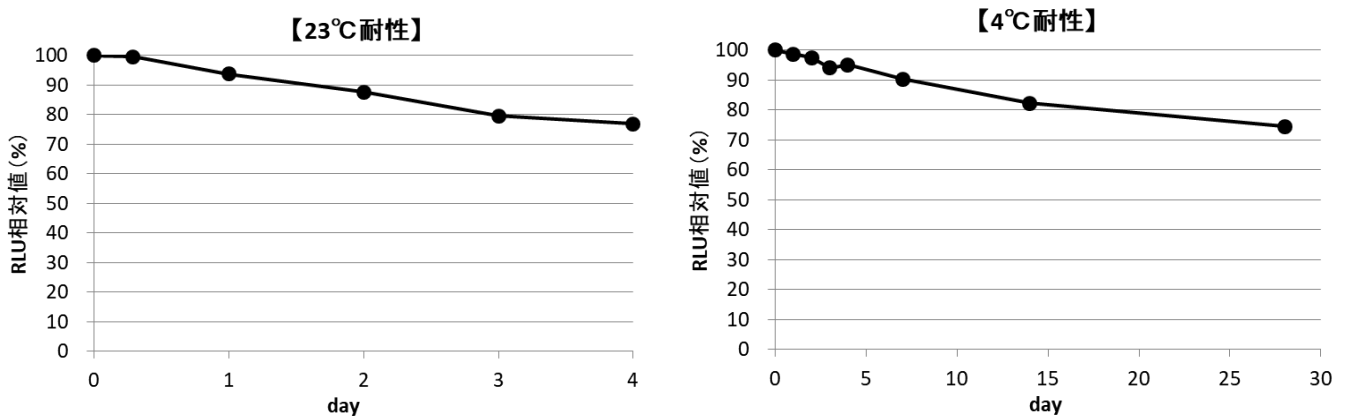


図 4. ATP 発光試薬(調製後)の室温耐性および冷蔵耐性

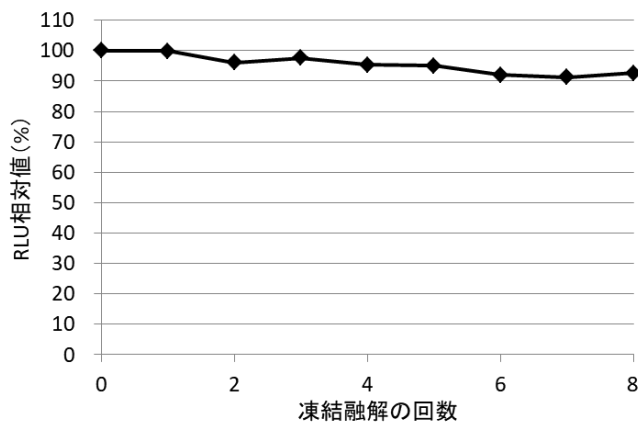


図 5. ATP 発光試薬(調製後)に対する凍結融解の影響

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"> ● 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)。 ● ATP 標準試薬を用いて、ATP 発光試薬(調製済)の性能確認を行って下さい。
	ATP 発光試薬(調整済)が室温に戻っていない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
	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"> ● 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。
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"> ● 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。 ● 検体を希釈して下さい。
	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"> ● 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。
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"> ● 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。
	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"> ● 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。

VI. 関連製品

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
Intracellular ATP 測定キット Ver.2	IC2-100	<ul style="list-style-type: none"> ・ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品) ・ATP 発光試薬溶解液(12 ml) ・ATP 抽出試薬(12 ml) ・ATP 標準試薬(1×10^{-3} M, 1ml) 	-20°C (調製後は-80°C)
Intracellular ATP 測定用 ATP 抽出試薬 4 本セット Ver.2	IC2-106-4	<ul style="list-style-type: none"> ・ATP 抽出試薬(12 ml) × 4 本 	4°C以下
『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2	CA2-10 CA2-50 CA2-100 CA2-1000	<ul style="list-style-type: none"> ・10ml × 1 本 ・50ml × 1 本 ・50ml × 2 本 ・50ml × 20 本 	-20°C
『塊の』ATP 測定試薬® Ver.2.1	KA2.1-10 KA2.1-50 KA2.1-100 KA2.1-1000	<ul style="list-style-type: none"> ・10ml × 1 本 ・50ml × 1 本 ・50ml × 2 本 ・50ml × 20 本 	-80°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。(9:00～17:30)

問い合わせ先

東洋ビーネット(株)バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目 2 番 1 号
TEL:090-4386-0106 FAX:03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>