

動物全血用 ATP 抽出・測定システム

『血液の』ATP 測定キット (BA100)

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	7
V. トラブルシューティング	8
VI. 使用上の注意	10

保存温度	-20°C ※調製後の ATP 発光試薬: -80°C (遮光)
使用期限	外箱に記載

I. キットの概要

『血液の』ATP 測定キット「BA100」は、血液から速やかにアデノシン三リン酸(ATP)を抽出し、抽出した ATP 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法により測定する試薬です。キットに含まれる血液希釈液は、ATP 抽出や発光反応に影響を与えないよう設計された専用の希釈液です。また、専用の ATP 抽出試薬により、血液中の ATP を効率よく抽出でき、ATP 量を高感度に測定することができます。『血液の』ATP 測定キットは、シングルチューブ型のルミノメーターに適した少数検体向けの製品です。

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^{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1)。

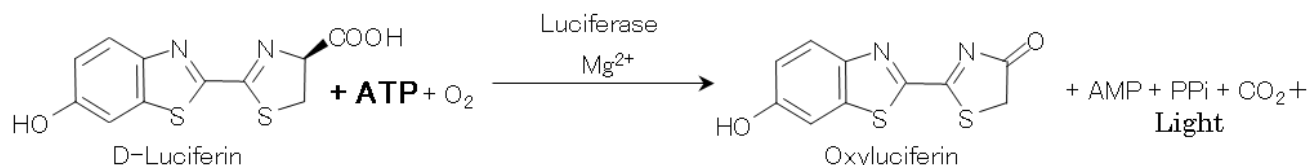


図1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
『血液の』ATP 測定キット (100回用)	BA100	<ul style="list-style-type: none">・ATP 発光試薬 (凍結乾燥品)・発光試薬溶解液 (12ml)・血液希釈液 (5倍濃 50ml) × 2本・ATP 抽出試薬 (24ml)・ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7}M$, 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。

<キット構成以外に必要な試薬>
(抗血液凝固剤)、滅菌水

試薬の準備	
ATP 発光試薬の調製	<p>1. 発光試薬溶解液、ATP 発光試薬(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ 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。</p> <p>2. 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、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。</p> <p>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。</p> <p>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(凍結乾燥品)に発光試薬溶解液を加えて調製した <u>“ATP 発光試薬(調製済)”</u>は、<u>-80℃にて遮光保存</u>して下さい。</p> <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>
血液希釈液	<p>☞一度の測定で使い切らない場合は、希釈前の原液(5倍濃)を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。</p> <p>☞血液希釈液の融解後は転倒混和により混和し、ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避けて下さい。</p>
ATP 抽出試薬	<p>☞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。</p>
ATP 標準試薬	<p>☞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。</p>

抗血液凝固剤によるルシフェラーゼ発光反応の阻害確認

ご使用の抗血液凝固剤が発光反応を阻害するかどうかの確認

1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。
2. ご使用の抗血液凝固剤 (血液サンプルと同濃度のもの) を滅菌水で 10,000 倍希釈します。
☞ 希釈ブレを防ぐため、2 段階で希釈することを推奨します。
ex) 100 倍希釈 \times 2
3. 2. で調製した溶液を用いて ATP 標準試薬を 10 倍希釈し、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (抗血液凝固剤 ver) ”を 100 μl 調製します。
4. 2. と同様に、滅菌水を用いて ATP 標準試薬を 10 倍希釈し、“ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液 (滅菌水 ver) ”を 100 μl 調製します。
5. 3. および 4. のチューブに、ATP 抽出試薬 100 μl を添加し、4~5 回転倒混和します。
6. 測定用チューブ 2 本に、5. で調製した溶液 100 μl を移します。
☞ チューブ 1 : ATP 溶液 (抗血液凝固剤 ver) を含む溶液
チューブ 2 : ATP 溶液 (滅菌水 ver) を含む溶液
7. 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 5 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> 血液からの ATP の抽出・発光量の測定

①	血液希釈液(1倍濃)の調製	<ol style="list-style-type: none"> 血液希釈液(5倍濃)を融解後、滅菌水で5倍希釈し、血液希釈液(1倍濃)を調製します。 ☞ <血液希釈液(1倍濃)の必要量> ステップ②にて、血液サンプルを10,000倍希釈(100倍希釈×2回)するのに必要な量。10,000倍希釈後の血液サンプルは、その後のATP抽出操作において100μl必要です(基本プロトコルの場合)。 調製した血液希釈液(1倍濃)を4℃に冷却します。
②	血液サンプルの希釈(10,000倍)	<ol style="list-style-type: none"> 抗血液凝固剤が添加された新鮮な血液に、冷却した血液希釈液(1倍濃)を加え、氷中で100倍希釈します。 同様に、3.の溶液をさらに100倍希釈します。 ☞最終的に、血液サンプルは、血液希釈液(1倍濃)で10,000倍希釈された状態になります。3.&4.のステップで100倍希釈を2回行いますが、一度に10,000倍希釈することは避けて下さい(希釈ブレを防止するため)。100倍希釈よりも低い倍率で希釈することも可能ですが、最終希釈倍率は10,000倍に設定して下さい。 4.の溶液をボルテックスミキサーで懸濁します。
③	ATP抽出	<ol style="list-style-type: none"> 5.の溶液100μlを新しいチューブに移し、室温に戻したATP抽出試薬100μlを添加して、4~5回転倒混和します。 ☞ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避けて下さい。 ☞ATP抽出試薬の添加後は、室温で作業を行って下さい。氷中では、ATPの抽出が不十分となることがあります。 ☞抽出後のATPは室温にて30分以内が特に安定です。ATP抽出後は30分以内にステップ④の発光測定を終了することを推奨します。 <p>◆ATPを抽出した検体溶液は、タンパク質測定のための検体として使用することも可能です。 ☞ATP抽出試薬には、界面活性剤が含まれています。タンパク質アッセイを行う場合は、界面活性剤に耐性のあるタンパク質アッセイ試薬を使用して下さい。 ex)BCA法</p>
④	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> ATPを抽出した6.の溶液から100μlを抜き取り、発光測定用チューブに移します。 室温に戻したATP発光試薬(調製済)100μl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5秒後に測定を開始する
⑤	ATP量の算出	<ol style="list-style-type: none"> ATP濃度と発光量から作成した検量線(6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。(6ページ参照)

<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	<ol style="list-style-type: none"> 1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調製済) を室温に戻します。 2. 血液希釈液 (5 倍濃) を融解後、滅菌水で 5 倍希釈し、血液希釈液 (1 倍濃) を調製します。
②	希釈系列の調製	<ol style="list-style-type: none"> 3. 血液希釈液 (1 倍濃) 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。 <small>☞ 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。</small> 4. 2. で調製した各濃度の ATP 溶液 100 μl を各々チューブに入れます。
③	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> 5. ATP 抽出試薬 100 μl をチューブに添加します。 6. 5. の溶液から 100 μl を抜き取り、発光測定用チューブに移します。 7. 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。 8. 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。

☞ 測定条件・方法は、実際の検体を測定する場合と同一にして下さい。

※ 上記プロトコルにより、ATP 発光試薬 (調整済) の発光活性を確認することが出来ます。
その場合は、ステップ②において、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の ATP 溶液のみを調製します。

IV. 参考データ

A. ATP 濃度と発光量の相関

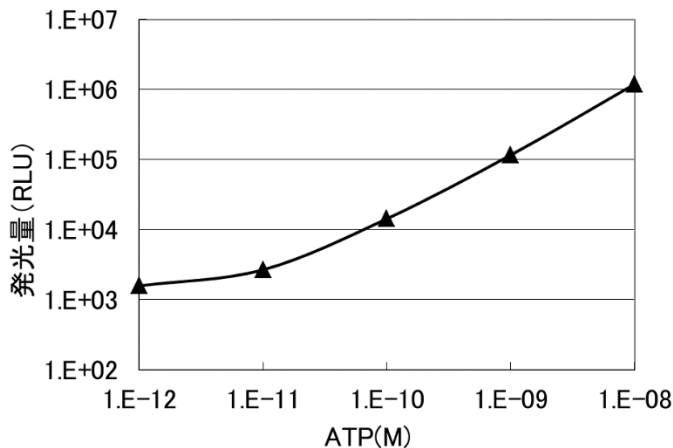


図 2. ATP 検量線

血液希釈液(1倍濃)でATP標準試薬(1×10^{-7} M)の10倍希釈系列を調製し、プロトコルに従って発光量を測定(n=2)。

※相関係数は、0.999以上

B. 抗血液凝固剤の発光への影響

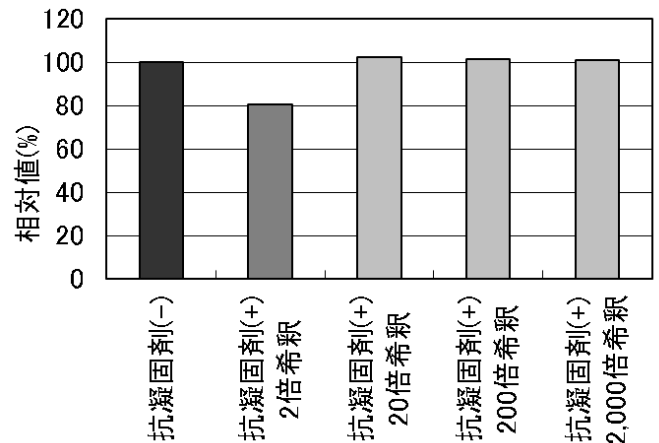


図 3. アルセバー氏液の発光への影響

抗凝固剤(アルセバー氏液)を血液希釈液で希釈し、抗凝固剤による発光反応への影響を確認した。

※グラフは、アルセバー氏液無添加の場合の発光量を100%とした相対値で表示。

C. ATP 抽出操作後の ATP の安定性

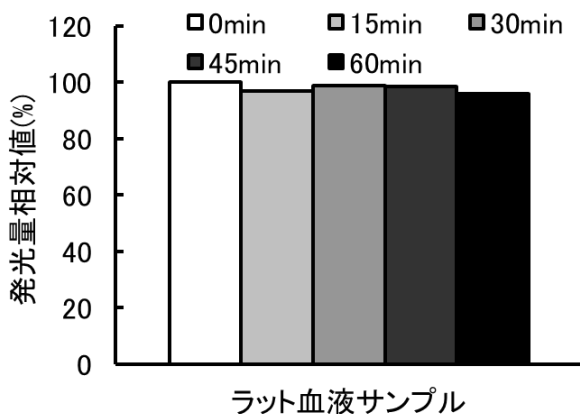


図 4. ATP 抽出操作後の ATP 量の経時変化

抗凝固剤(アルセバー氏液)を添加したラット血液をサンプルとし、プロトコルに従って希釈した後、ATP抽出試薬を添加。添加から0, 15, 30, 45, 60分後の発光量を測定した(n=2)。

※グラフは、ATP抽出試薬の添加から0分後の発光量を100%とした場合の相対値を示す。

D. 発光キネティクス

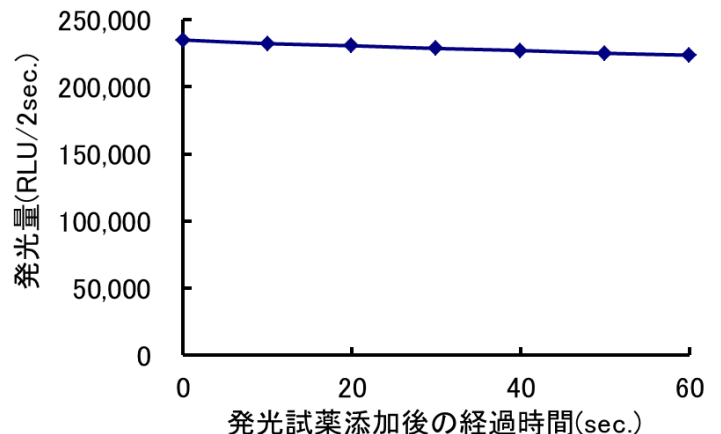


図 5. 血液由来 ATP の発光キネティクス

プロトコルに従って、抗凝固剤(アルセバー氏液)を添加した血液サンプルにおけるATP発光量を測定。

※グラフは、発光試薬添加後の60秒間の発光キネティクスを示す。

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。	検体中(血液中)の ATP 量が非常に少ない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 測定した検体の発光量からバックグラウンドシグナルを差し引いて下さい。 <p>＜バックグラウンドシグナルの測定方法＞</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 血液希釈液(1倍濃)と ATP 抽出試薬の等量混合液を調製する。 2. 測定チューブに、1. の溶液 100 μl を入れる。 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する。 <p>☞測定条件・方法は、実際の検体を測定する場合と同一にして下さい。</p>
	血液中の ATP が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 新鮮な血液を使用して下さい。
	血液サンプルを希釈する過程で、ATP が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> ● ATP 抽出試薬を加えるまでの操作は、全て氷中(または 4℃)で行って下さい。 ● 血液希釈液および使用器具は、氷中で冷却したものを使用して下さい。
	抗血液凝固剤が発光反応を阻害している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 抗血液凝固剤による発光反応の阻害がないか確認して下さい(4 ページ参照)。阻害が強すぎる場合は、抗血液凝固剤を変更することを推奨します。
	血液からの ATP の抽出が不十分である。	<ul style="list-style-type: none"> ● ATP 抽出試薬は必ず室温に戻してから使用して下さい。 ● 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。 ● 希釈した血液サンプルと ATP 抽出試薬は、等量ずつ混合して下さい。
	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(6 ページ参照)。
	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。 	
バックグラウンド発光量が高い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 滅菌済みの器具・容器を使用して下さい。 	

問題	原因	解決法
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 ATP 量が多い。	<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。 ● 測定時の ATP 濃度を下げるために、ステップ②(5 ページ参照)の血液サンプルの希釈倍率を上げて下さい。
	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。
	血液中の ATP 量に個体差がある。	<ul style="list-style-type: none"> ● 個体差により、ATP 量に差異が認められます。
	保存中に血液中の ATP が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 保存血液で ATP 量を測定する場合は、同一条件で保存している血液を使用して下さい。
	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. 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>