

動物組織、血液、微生物用 ATP 抽出・測定試薬
AMERIC-ATP Kit
(ATP レベル検査キット)
使用説明書

【特徴】

- ・ 本製品は ATP を効率的に抽出し、ルシフェラーゼ反応を用いて ATP 量を測定するための試薬キットです。
- ・ 本製品に含まれる独自の抽出試薬およびプロトコールによって、高い ATP 抽出効率を実現しました。これまで正確な測定が困難であった動物組織や血液サンプルにおいても高感度かつ定量的に ATP 量を測定することが可能です。
- ・ 本製品を用いて抽出した ATP は、 -20°C で半年間以上安定に保存することができます。本製品は動物組織、血液、培養細胞、微生物などをサンプルとして用いることができます。本製品で 50 回程度のサンプルの ATP の定量が可能です。

【注意事項】

- ・ 本製品は国立大学法人徳島大学により、特許使用許諾を受けた応用酵素医学研究所 株式会社が生産する製品です。研究・商用利用問わず、本製品を使用せずに無断で当該特許技術を利用することはできません。
- ・ 本製品は研究以外の目的には使用しないで下さい。本製品使用の際は、手袋、保護用メガネなどで身体保護を施し、試薬の身体への接触は避けて下さい。万一、試薬が目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。

特願2008-017863 (国際出願番号 PCT/JP2009/051364)

【試薬】

抽出試薬 A (医薬用外劇物:フェノール含有)	20 ml × 1 本
抽出試薬 B (医薬用外劇物:クロロホルム含有)	30 ml × 1 本
ルシフェラーゼ溶液	× 1 本
ATP 標準液(10^{-7} M)	500 μl × 1 本
測定用緩衝液	6 ml × 1 本

※ 本製品は医薬用外劇物を含むため、容器や外箱の記載事項を完全に理解してからご使用ください。製品安全データシート(MSDS)は弊社ホームページ上にてご提供していますので、使用前にご確認下さい。

【使用期限】

6ヶ月(未使用で -20 °C 保存の場合)

※ 本製品を受け取り後、ただちに -20 °C で保存して下さい。

【ご使用上の注意】

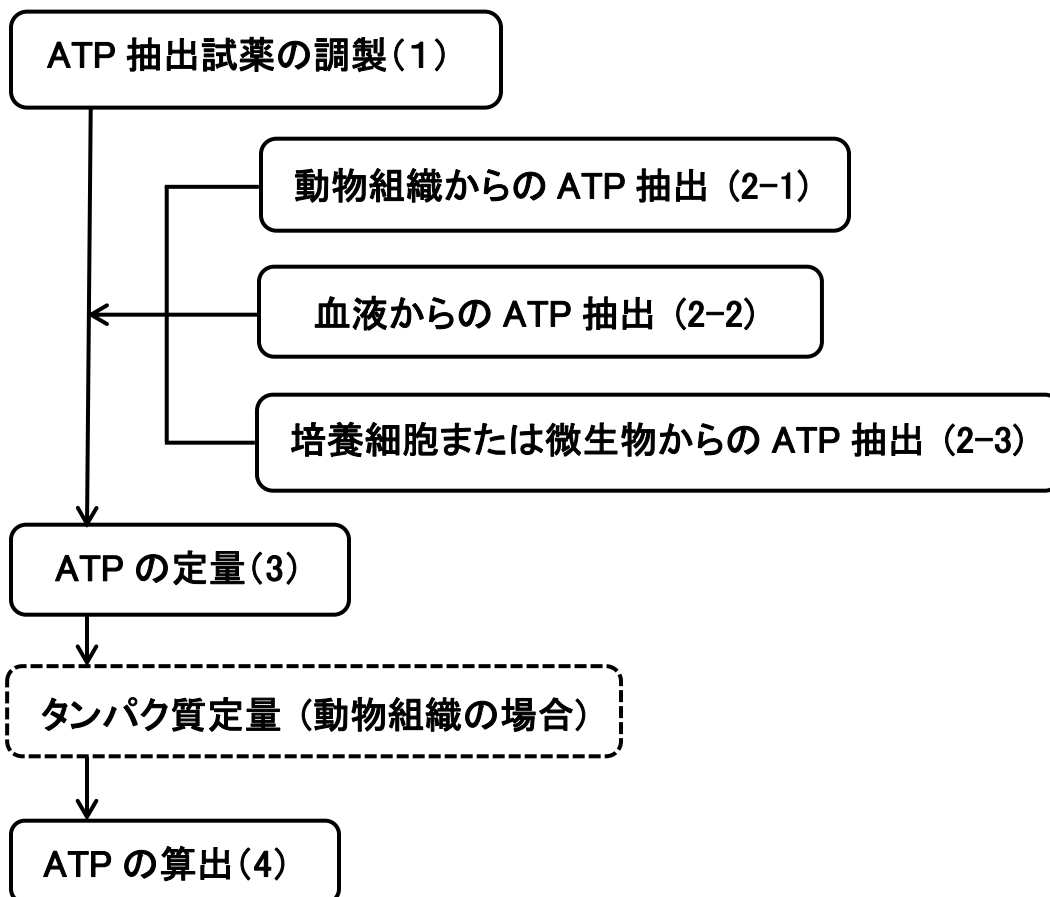
※ 測定用緩衝液で希釈したルシフェラーゼ溶液は保存出来ません！

サンプルから抽出した「ATP 抽出溶液」は、-20 °C で半年以上安定に保存可能ですので、測定は出来るだけまとめて実施すると、無駄がなく効率的に使用できます。

※ 開封後、異物の混入、微生物の増殖、変色などが認められた場合、使用をただちに中止して下さい。

※ 採血時に使用する抗凝固剤のうち、EDTA、EGTAは、Mgを減少させてルシフェラーゼ活性を阻害する可能性があります。ヘパリンの使用を推奨致します。

【ATP 測定方法の概要】



【本製品以外に準備するもの】

- ・ ルミノメーター
- ・ 測定用チューブ(測定用プレート)
- ・ 遠心分離機
- ・ マイクロピペッター
- ・ プラスチックチップ／マイクロチューブ
- ・ 滅菌超純水(比抵抗値 18MΩ ml 以上)
- ・ 手袋／保護用メガネ
- ・ ホモジナイザー(動物組織の測定の場合)
- ・ 生理食塩水(培養細胞または微生物の測定の場合)

【プロトコール】

(1) ATP 抽出試薬の調整(用時調製)

- 1)抽出試薬 A を室温で解凍します。
- 2)下記の組成で「ATP 抽出試薬」をマイクロチューブに調製します。

抽出試薬 A	300 μl
抽出試薬 B	500 μl
滅菌超純水	500 μl
	1,300 μl

※ 解凍後、抽出試薬 A は 2 層に分離します。「ATP 抽出溶液」の調製には下層（黄色の層）を使用して下さい。

- 3)使用時まで氷上で保存します。

(2-1) 動物組織からの ATP 抽出

- 1)動物組織 100 – 200 mg に滅菌超純水 3.0 ml を加えて、氷中でホモジナイズします。

※ 組織に血液が付着している場合は、滅菌超純水で洗浄します。

- 2)遠心分離(1,000 x g , 5 min, 4 °C)をします。
- 3)上清 500 μl を回収して、新しいマイクロチューブに移します。

※ 1)-3)の操作は、ATP の分解を避けるためにできるだけ迅速に行ってください。

- 4)ATP 抽出試薬に上清 100 μl を添加後、10 秒間激しく攪拌します。

※ 残りの上清は凍結してタンパク質定量に用いることが可能です。組織のタンパク質を定量することで、組織のタンパク量に対する ATP 量を算出することを推奨します。

※ ATP 抽出試薬と混合した上清は、-20 °C で凍結保存が可能です。ATP の定量を開始する際は、サンプルを解凍後に攪拌して下さい。

- 5)遠心分離(10,000 x g , 5 min, 4 °C)をします。

6) 遠心分離した後、上清 50 μ l を新しいマイクロチューブに回収します。

これを「ATP 抽出溶液」とします。

※上層の水層と下層のフェノール層の間に変性したタンパク質の層が認められますが、これは回収しないで下さい。また、タンパク質の層が多く、上清の回収が困難である場合はホモジナイズする組織の量を減らして下さい。

※ ATP 抽出溶液は、 -20°C で凍結保存が可能です。

(2-2) 血液からの ATP 抽出

1) 採血した血液 100 μ l を、先端を切断したチップで回収した後、その全量を ATP 抽出試薬に添加します。

※ ATP 抽出試薬は静置すると2層に分離しますので、上層(透明な層)に血液を加えます。

※血液の一部がチップ内に付着する場合は、よく洗います。

※採血した血液は、直ちに ATP 抽出試薬と混合して下さい。

2) 直ちに、20 秒間以上激しく攪拌します。

3) 遠心分離(10,000 x g, 5 min, 4°C)をします。

4) 遠心分離した後、上清 50 μ l を新しいマイクロチューブに回収します。これを「ATP 抽出溶液」とします。

※ ATP 抽出溶液は、 -20°C で凍結保存が可能です。

(2-3) 培養細胞または微生物からの ATP 抽出

1) 細胞または微生物を含む培養液をコニカルチューブに回収後、遠心分離(1,000 – 10,000 x g, 5 min, 4°C)をします。

※細胞または微生物の湿重量が 100–200 mg になるように、遠心する培養液の量を調整して下さい。

2) 上清を捨てて、生理食塩水 10 ml を加えて、細胞ペレットを細胞が壊れないように洗浄(懸濁)します。

3) 再度、遠心分離(1,000–10,000 x g, 5 min, 4°C)をします

4) 上清を捨てて、生理食塩水 3 ml を加えた後、細胞ペレットを細胞が壊れないように洗浄(再懸濁)します。

※生理食塩水の代わりに、PBSを使用しても問題はありません。

5) 細胞懸濁液 1 ml を回収して、新しいマイクロチューブに移します。

※残りの細胞懸濁液は、細胞数の計測に使用可能です。細胞数を計測することで、細胞数に対する ATP 量を算出することを推奨します。

6) ATP 抽出試薬に細胞懸濁液 100 μ l を添加して、20 秒間激しく攪拌します。

7) 遠心分離(10,000 x g, 5 min, 4°C)をします

8) 遠心分離をした後、上清100 μ l を新しいマイクロチューブに回収します。

これを「ATP 抽出溶液」とします。

※遠心分離をした後、上層の水層と下層の中間に変性タンパク質の層が認められますが、これは回収しないで下さい。

※ ATP 抽出溶液は、 -20°C で凍結保存が可能です。

(3)ATP の定量

- 1)測定用緩衝液を室温で融解します。
- 2)ルシフェラーゼ溶液の全量を測定用緩衝液 6 ml に添加した後、ゆっくりと混合します。
- 3)ATP 標準液を融解後、滅菌超純水で希釈して、10 倍希釈系列の溶液 (10^{-7} から 10^{-12} M)を調製します。
- 4)希釈した ATP 標準液 10 μ l に、ルシフェラーゼ溶液 90 μ l を加えて混合した後、ただちにルミノメーターで発光量 (RLU) を測定します。
※発光量を測定する際には、バックグラウンドとして滅菌超純水も併せて測定することを推奨します。
※ここでの発光量 (RLU) の値は、検量線の作成に使用します。
- 5)ATP 抽出溶液を滅菌超純水で任意の濃度に希釈します。
※使用するルミノメーターやサンプル等によって希釈倍率は異なります。
動物組織の場合は 1,000 - 2,500 倍、血液の場合は 50,000倍、培養細胞や微生物の場合は 50 - 500 倍の希釈が目安です。
※希釈を正確に行うことで、安定した結果が得られます。
- 6)希釈した ATP 抽出溶液 10 μ l にルシフェラーゼ溶液 90 μ l を加えて混合した後、ルミノメーターで発光量 (RLU) を測定します。
- 7)この発光量 (RLU) と検量線および希釈率から、組織中に含まれる ATP 量を算出します。
※算出方法の詳細につきましては、「(4) ATP レベルの算出」を参照して下さい。弊社のホームページより、ATP レベルを算出するためのフリーソフトウェア(Excel形式)を配布しております。

(4)ATP レベルの算出

- 1)弊社のホームページ (<http://www.americ.co.jp/>) 上のページから「ATP Soft.xls」をダウンロードします。
- 2)ダウンロードした「ATP Soft.xls」を起動します。
- 3)サンプルの「シート」から解析したいシートを選択します。
※「動物組織(g protein)」シートは、動物組織中のタンパク質量あたりの ATP レベルを算出できます。「細胞・微生物(cells)」シートは、細胞または微生物の細胞数あたりの ATP レベルの算出に使用します。「血液(ml)」シートは、血液の容量あたりの ATP レベルの算出に使用します。
- 4)「検量線」の「発光量 (RLU)」のセルに 10 倍希釈系列の溶液(10^{-7} から 10^{-12} M)の発光量 (RLU) を入力します。「0」のセルには滅菌超純水の値を入力して下さい。
- 5)全てを入力すると検量線が作成されます。
- 6)「ATP レベル算出シート」の「タンパク質(mg/ml)」の列に、測定した動物組織のタンパク質濃度を入力します。

※ この入力操作は、動物組織の場合のみ必要です。

7)「ATP レベル算出シート」の「細胞数 (cells/ml)」の列には、計測した細胞または微生物の細胞数を入力します。

※ この入力操作は、培養細胞または微生物の場合のみ必要です。

8)「ATP レベル算出シート」の「希釈倍率」の列には、測定時の ATP 抽出溶液の希釈率を入力します。

※ ATP 抽出溶液を 1,000倍希釈して測定した場合、「1000」と入力して下さい。この入力操作は、動物組織あるいは培養細胞または微生物の場合のみ必要です。

9)最後に、「ATP レベル算出シート」の「発光量 (RLU)」の列に、ルミノメーターで測定した ATP 抽出溶液の発光量 (RLU) を入力します。

「ATP レベル」の列に、それぞれのサンプルの ATP 量が表示されます。

【トラブルシューティング】

本製品を用いても期待した結果が得られなかった場合、下記の原因が考えられます。

トラブル	可能性	解決法
発光量が低い	ATP が分解している	<ul style="list-style-type: none"> サンプルは、新鮮なものを使用して下さい。また、ホモジナイズ・遠心分離等のサンプル処理は低温で迅速に行い、ATP 抽出試薬と混合して下さい。 ATP 抽出溶液は、-20 °C 以下で保存して下さい。 希釈した ATP 抽出溶液は長時間、室温に放置せず、速やかにルミノメーターで発光量を測定して下さい。
	ATP 抽出溶液の希釈率が高い	<ul style="list-style-type: none"> ATP 抽出溶液の希釈率を下げます。
	ルシフェラーゼ活性が低い	<ul style="list-style-type: none"> ルシフェラーゼ溶液を調製する際には、激しい攪拌は避けて下さい。また、室温での長時間の放置を避けて、専用の測定用緩衝液で希釈します。
	測定条件が適当でない	<ul style="list-style-type: none"> <u>ルシフェラーゼ溶液が室温に戻ってから測定を開始して下さい。</u>また、ルシフェラーゼ溶液を長時間、室温に放置することは避けて下さい。 ルミノメーターの測定時間(積算時間)を長めに設定して下さい。積算時間は、5-10 秒が目安です。

トラブル	可能性	解決法
発光量が高い	ATP 抽出溶液の希釈率が低い 洗浄が不十分である	<ul style="list-style-type: none"> ・ ATP 抽出溶液の希釈率を上げます。 ・ 組織に血液が付着している場合には、滅菌超純水またはPBSで組織をよく洗います。 ・ 培養細胞または微生物から ATP を抽出する場合は、遠心操作を繰り返し行い、培養液を除去して下さい。
発光量が安定しない	試薬の混合が不十分である 希釈操作が正確でない 測定条件が適当でない	<ul style="list-style-type: none"> ・ ルシフェラーゼ溶液と測定用緩衝液が室温に戻っていることを確認した後、ゆっくり混合して下さい。 ・ ATP 抽出溶液を 100 倍以上の濃度に希釈する場合には、2 段階以上での希釈を行い、その際に ATP 抽出溶液は少なくとも 10 μl 以上を使用して下さい。 ・ 同一検体において、希釈した ATP 抽出溶液を 2つ以上調製し、発光量の平均値を算出して下さい。また、それぞれの値が大きく異なる場合は再測定を行います。 ・ ルミノメーターの測定時間(積算時間)を長めに設定して下さい。また、検量線を作成した際に、直線になる発光量の範囲内での測定をして下さい。 ・ ルシフェラーゼ溶液を添加後すぐに測定をして下さい。また、測定開始時間を一定 (2 秒程度)にします。
バックグラウンドが高い	器具等に ATP が混入している 試薬等に ATP が混入している	<ul style="list-style-type: none"> ・ 使用するチップやチューブ等は新しいものを使用して下さい。 ・ 使用する滅菌超純水等は用事調製し、古いものの使用は避けて下さい。
再現性がとれない	実験条件が異なる	<ul style="list-style-type: none"> ・ 動物組織の場合、同一組織のできるだけ同一部位を摘出するようにして下さい。また、ホモジナイズをする組織に付着している血液は、滅菌超純水でよく洗って下さい。 ・ 血液を用いる場合、採血後、すぐに血液を ATP 抽出試薬に添加します。

トラブル	可能性	解決法
再現性がとれない	実験条件が異なる	<ul style="list-style-type: none"> 培養細胞または微生物を用いて比較実験を行う場合、培養液や培養温度等を同一の条件で行って下さい。また、速やかに細胞を洗浄した後、ATP 抽出試薬に添加して下さい。
	検量線を作成していない	<ul style="list-style-type: none"> <u>検量線は測定の都度、作成して下さい。</u>
	測定条件が異なる	<ul style="list-style-type: none"> ルミノメーターの設定は、前回と同様の測定条件で行って下さい。

【保証】

- 本製品に不具合があった場合、代替品を提供いたします。それ以外の補償はご容赦ください。本製品の使用上生じたお客様の直接的または間接的な損害につきましては当社はその責を負いません。


AMERIC
 応用酵素医学研究所 株式会社

〒770-0873

徳島県徳島市東沖洲 2 丁目 1-7

TEL: 088-678-4168 FAX: 088-678-4169

Email : atp-info@americ.co.jp

URL : <http://www.americ.co.jp>