

\*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。

<https://www.cellspect.com/>

### 測定の意義

本キットは、大腸菌数を測定するためのキットです。  
現在大腸菌数はシャーレ上に作製した寒天培地や試験管内に作製した液体培地を用いて、24 時間程度かけて培養することによって測定されています。培地を作製する際にはクリーンな環境が必要で、菌の計測には分析者の主観が入る可能性もあります。本キットはこのような既存の技術の欠点を全て克服した、簡易、迅速、低コストの大腸菌測定技術です。さらに、一度に 96 サンプルを同時に分析することもできます。本キットは、下水、工場排水、河川水、地下水、飲料水など、あらゆる液体中の大腸菌数を測定可能で、水系感染症や食中毒の原因となる糞便汚染を迅速に検出します。

### 測定原理

大腸菌用培地には大腸菌の増殖を促進する有機化合物や無機化合物、さらには大腸菌用の特定酵素基質が含まれている。大腸菌用の特定酵素蛍光基質は、大腸菌が特異的に生産する酵素（ $\beta$ -D-グルクロニダーゼ）の基質である  $\beta$ -D-グルクロニドに蛍光分子が結合したものであり、これ自体は蛍光を発しないが、 $\beta$ -D-グルクロニドが分解されると蛍光分子が遊離し蛍光が生じる。

蛍光強度は特定酵素蛍光基質の分解量に比例するので、蛍光強度の時間変化（傾き）は酵素活性に等しい。

酵素活性は酵素量、すなわち大腸菌数に等しい。

$\beta$ -D-ガラクトピラノシドに蛍光分子が結合した特定酵素蛍光基質を用いれば、大腸菌群数を測定できる。

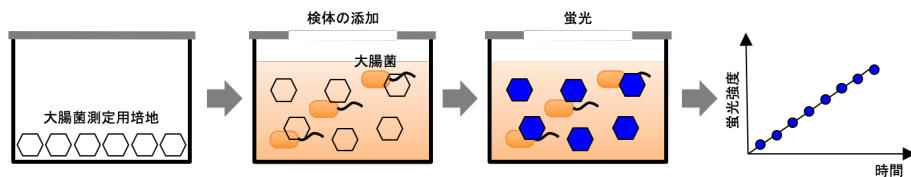


図1 測定原理

### キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: RECEL964)

1. 大腸菌選択性凍結乾燥培地含有プレート	96well × 4
-----------------------	------------

### キット以外に必要な器具・試薬

- 蛍光マイクロプレートリーダー
- マイクロピペットおよびチップ
- ピンセット等の先端が鋭利なもの

### 操作方法

#### 測定

試料の採取地点が異なる場合、及び本キットのロットが異なる場合は、注意点(3)に記載の方法で検量線を作成してから測定に使用してください。

- (1) プレートリーダーを 37°C に設定する。
- (2) プレートに貼付してあるシールに穴を開ける(またはシールを剥がす)。
- (3) 測定試料を培地入り 96 ウェルプレートのウェルに 200  $\mu$ L ずつ分注する。
- (4) 励起波長 360 nm, 測定波長 460 nm に設定し、10 分毎に 3 時間測定する。

### 注意点

#### 1. 測定試料

- 試料は新鮮なもの又は冷蔵保管されたものを使用して下さい。
- 試料はよく混和した上、細菌汚染に注意して無菌的に採取してください。
- 試料を加える際に、培地成分が飛散しないように注意してください。
- 微生物の取扱いは常に感染の危険がありますので、取扱いに当たっては熟練した人の指導のもとに、バイオハザード対策を実施した上で使用してください。

#### 2. 測定

- 培地入り 96 ウェルプレートはできるだけ光を当てないでください。
- 容器が破損したものや異物が混入したものは使用しないでください。
- 使用期限が過ぎたものは、品質を保証できませんので使用しないでください。
- 培地入り 96 ウェルプレートは、底面に培地が固着されています。ピペット等との接触により剥離すると、バラツキの要因になります。ピペット等がプレートの底面や壁面に触れないようにしてください。
- プレートは、開封前に必ず室温(20~25°C)に戻してから使用して下さい。
- 蛍光プレートリーダーの gain の調整を行ってから測定をしてください。
- 試料の大腸菌数が少ない場合は、測定時間を延長してください。
- 腸管出血性大腸菌 O157:H7 は、 $\beta$ -グルクロニダーゼを生産しないため、本培地では大腸菌としての検出はできません。
- 使用後の培地・容器・器材等はオートクレーブ等で滅菌処理したのち、廃棄物に関する規定に従って処理してください。

#### 3. 検量線の作成

本キットを使用して大腸菌数を測定する際は、下記の手順で検量線を作成してください。

- 採取地点より採取した大腸菌を希釈し、大腸菌数の異なる試料を調製する。
- 調製された試料を、大腸菌測定用寒天培地で培養する。
- 培養に使用した試料を本キットで測定し、蛍光強度の変化量を求める(傾き)。
- 培養された大腸菌から、大腸菌数を算出する。
- 得られた大腸菌数と、蛍光強度の変化量から検量線を作成する。

#### 製品仕様

測定数：96 測定 × 4 枚  
測定方法：酵素活性測定法  
励起波長：360 nm  
測定波長：460 nm  
測定試料：下水、工場排水、河川水、地下水、飲料水  
保管温度：2-8℃保管  
品質保証期限：本品の有効期限は製造後 6 カ月です。

#### 参考文献

- 1.) Hisashi Satoh, Kai Kikuchi, Yutaka Katayose, Shu Tsuda, Reiko Hirano, Yuga Hirakata, Masaaki Kitajima, Satoshi Ishii, Mamoru Oshiki, Masashi Hatamoto, Masahiro Takahashi, Satoshi Okabe (2020) Simple and Reliable Enumeration of Escherichia coli Concentrations in Wastewater Samples by Measuring  $\beta$ -D-glucuronidase (GUS) Activities via a Microplate Reader. Science of The Total Environment. In press
- 2.) 佐藤 久、津田 収、菊池 凱、平野 麗子 (2019) 特定酵素蛍光基質を用いた下水中の大腸菌群の簡易迅速測定方法の開発. 下水道協会誌. 56(684), 110-117.

#### 製造販売業者

セルスペクト株式会社  
〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡 2-4-23  
※クオリサーチは、セルスペクト株式会社の試薬キットの名称です。

#### 問い合わせ先

セルスペクト株式会社  
TEL：019-134-6616  
e-mail：support@cellspect.com  
URL：https://www.cellspect.com/

- ※ 本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用できません。
- ※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は下記弊社 web サイトのサポートコーナーでご確認下さい。  
<https://www.cellspect.com/>
- ※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承ください。
- ※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承ください。
- ※ 品質に関してのお問い合わせの際は試薬キット包装袋に貼付の Lot No.をご確認の上、お問い合わせ下さい。
- ※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切にご使用下さい。
- ※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については付属の安全データシート (SDS) に従って下さい。