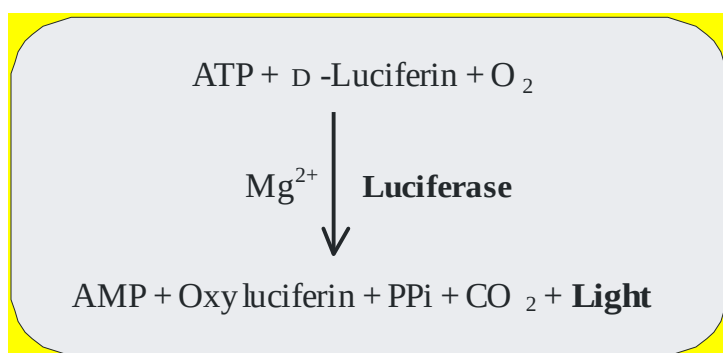


Набор для микробиологического исследования биомасс молочной продукции **Набор на 100 исследований**

CheckLite Milk - набор для микробиологического исследования биомасс молочной продукции, основанный на измерении уровня АТФ. Набор содержит термостабильную люциферазу светлячков и АТФ элиминирующий реагент. Набор CheckLite Milk – характеризуется легкостью в использовании и быстротой исследования молочной продукции.

Принцип измерения

БиOLUMИнесцентный реагент содержит люциферин светлячков и люциферазу. Люцифераза специфически взаимодействует с АТФ и катализирует следующую реакцию.



Количество биOLUMИнесценции производимой в данной реакции прямо пропорционально количеству АТФ в образце.

Все живые клетки, включая, клетки микроорганизмов имеют АТФ, как собственный источник энергии. Поэтому общая клеточная масса может быть определена с помощью биOLUMИнесценции, основанной на люциферазной реакции, после выделения (экстракции) АТФ из клеток, используя АТФ высвобождающий реагент, который имеется в наборе. Уровень АТФ из-за экстрацеллюлярной АТФ и АТФ соматических клеток, находящихся в молочной продукции может иметь значение в несколько раз выше, чем фоновый уровень АТФ, присущий другим пищевым продуктам. Этот высокий уровень АТФ может быть помехой чувствительной детекции интрацеллюлярной АТФ выделенной из контаминированного микробами образца. Набор CheckLite Milk обеспечивает разрушение (разрыв) и высвобождение АТФ из соматических клеток и экстрацеллюлярной АТФ (АТФ разрушается до предельно низкой концентрации, сравнимой с традиционным методом, что делает возможным произвести чувствительную детекцию бактерий в образце молочной продукции).

Однако, главная проблема в том, что экстрацеллюлярная АТФ и соматическая АТФ может иметь высокие значения в некоторой молочной продукции, которая препятствует чувствительной детекции интрацеллюлярной АТФ.

Набор CheckLite Milk решает данную проблему, он производит разрушение и удаление АТФ соматических клеток и экстрацеллюлярной АТФ до предельно низких концентраций, что позволяет производить высокочувствительную детекцию бактерий в молочной продукции.

Хранение набора

Набор хранится в холодильнике при 2-8 °С. Не замораживать.

Состав набора

A. Реагент с люциферин-люциферазой «Luciferin-Luciferase reagent»:

2 пузырька с зеленой этикеткой (содержит D- Люциферин, очищенную светлячковую люциферазу, магнезии соль, TRICINE, и ДДТ в лиофилизированной форме)

B. Восстанавливающий буфер для реагента с люциферин-люциферазой «Reconstitution buffer for Luciferin-luciferase»:

2 пузырька бледно - розового цвета этикеткой по 5,5 мл – TRICINE буфер для растворения реагента с люциферин-люциферазой

C. АТФ выделяющий реагент «ATP releasing reagent»

5,5 мл x 2 пузырька светло-голубого цвета этикеткой – содержит сурфактант, используемый для экстракции АТФ из микробных клеток.

D. АТФ удаляющий реагент «ATP eliminating reagent»:

2 пузырька красновато-розового цвета этикеткой. Содержит фермент для разрушения АТФ и буферные соли в лиофилизированной форме.

E. Восстанавливающий растворитель «Reconstitution solvent»:

5,5 мл x 2 пузырька желтого цвета этикеткой – содержит стерильную воду для растворения АТФ удаляющего реагента.

F. Буфер для разведения образца «Sample dilution buffer»:

25 мл x 2-е пластиковых бутылки с темно – голубого цвета этикеткой

Данный MESS буфер содержит сахарозу, используемую для разведения исследуемых образцов.

G. Обработывающий образец реагент «Sample treating reagent»:

5,5 мл x 2-е пластиковых бутылки с коричневого цвета этикеткой. Содержит очищающее средство, используемое для высвобождения АТФ из соматических клеток и разрушения молочного жира.

Приготовление реагентов

1 БиOLUMИнесцентный реагент раствор (A¹):

- (1) Реагент с люциферин-люциферазой находится под вакуумом – пузырек с зеленой этикеткой
- (2) Налейте восстанавливающий буфер из бледно-розового пузырька в открытый пузырек зеленого цвета и оставьте в течение нескольких минут при комнатной температуре.
- (3) Помешивайте пузырек аккуратно, чтобы не образовывались комочки. Перемешивайте до полного растворения
- (4) Постарайтесь не дотрагиваться до края горлышка пузырька или верхушки резиновой пробки руками, потому, что иногда это увеличивает бланк уровень реагента.
- (5) В нормальном состоянии один пузырек люциферин-люциферазного реагента может быть использован более чем на 50 исследований.

2 АТФ удаляющий реагент «ATP releasing reagent» раствор (D¹)

- (1) АТФ удаляющий реагент находится под вакуумом – пузырек красновато-розового цвета этикеткой
- (2) Налить Восстанавливающий растворитель «Reconstitution solvent» из пузырька желтого цвета этикеткой (E) в открытый пузырек с красновато-розового цвета этикеткой (D) и оставить в течение нескольких минут при комнатной температуре.
- (3) Помешивайте пузырек аккуратно, чтобы не образовывались комочки. Перемешивайте до полного растворения
- (4) В нормальном состоянии один пузырек АТФ удаляющего реагента может быть использован более чем на 50 исследований.

3 Другие реагенты (C, F, G)

- (1) Внесите реагенты в помещение с комнатной температурой.
- (2) Помешивайте пузырьки аккуратно и не трясите их сильно.

Хранение реагентов после приготовления

(1) Билюминесцентный реагент раствор (A¹):

Приготовленный реагент хранить ниже - 4 °С в морозильной камере.

Реагент может храниться при 2-8 °С, если будет использоваться несколько раз в течение дня.

(2) АТФ выделяющий реагент «ATP releasing reagent» (C)

Хранить ниже 2-8 °С в холодильнике

(3) АТФ удаляющий реагент «ATP releasing reagent» раствор (D¹)

Хранить ниже - 4 °С в морозильной камере.

(4) Буфер для разведения образца «Sample dilution buffer» (F)

Хранить ниже - 4 °С в морозильной камере.

(5) Обработывающий образец реагент «Sample treating reagent»

Хранить ниже 2-8 °С в холодильнике

Дополнительное оборудование (помимо набора)

(1) Необходим люминометр (фотоэлектронный умножитель), используемый для детекции и подсчета фотонов, такой, как Lumitester C – 100 (Kikkoman Corporation) - производит высокочувствительные измерения и дает хорошее соотношение сигнала/шума.

(2) Тест тубы

Полистириновые тест тубы (12 x 55 мм) необходимы для приготовления и измерения образцов.

(3) Пипетки и стерильные наконечники

Необходимы на 100, 700, или 800 мкл.

Инструкция по использованию набора.

1. Подтверждение чистоты реагентов.

Проверить возможность контаминации реагентов АТФ или микроорганизмами (когда реагент использовался снова после хранения).

Когда реагенты контаминированны, большое количество люминесценции определяется только с реагентов и вследствие этого точные результаты исследования не могут быть получены.

Используйте следующие реагенты для получения бланк уровня:

Буфер для разведения образца «Sample dilution buffer» (F)	100 мкл
+ АТФ выделяющий реагент «ATP releasing reagent» (C)	100 мкл
+ Билюминесцентный реагент раствор (A¹)	100 мкл

Производите измерение бланк уровня реагентов перед исполнением основного исследования.

Когда реагенты контаминированны, то выделяется большое количество билюминесценции, в таком случае произведите замену реагентов на свежие и повторите манипуляции по приготовлению реагентов.

2. Измерение

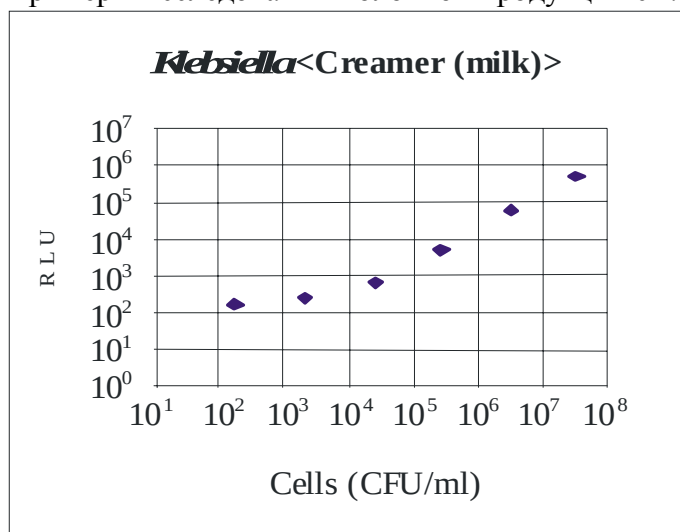
Метод «А» (для молока или молочной продукции)

- (1) Поместите 800 мкл буфера для разведения образца «Sample dilution buffer» (F) в тестируемую тубу и добавьте 100 мкл исследуемого образца и 100 мкл АТФ удаляющего реагента «ATP releasing reagent» раствор (D¹).
- (2) Перемешайте содержимое тестируемой тубы. Возьмите из нее 100 мкл содержимого и перенесите в другую тубу, для измерения. Оставьте образец при комнатной температуре на 30 минут для удаления АТФ из соматических клеток (из микробных клеток АТФ на данном этапе не удаляется).
- (3) Добавьте 100 мкл АТФ выделяющего реагента «ATP releasing reagent» (C) в тестируемую тубу и перемешайте, чтобы произошло хорошее выделение АТФ из микробных клеток.
- (4) Добавьте 100 мкл билюминесцентного реагента раствор (A¹) и немедленно произведите измерение уровня билюминесценции на приборе Lumitester C-100/(Kikkoman Corporation №60907).

Метод «В» (для сырого молока)

- (1) Поместите 100 мкл обрабатывающего образец реагента «**Sample treating reagent**» (G) в тестируемую трубу и добавьте 100 мкл исследуемого образца. Хорошо перемешайте содержимое тестируемой трубы.
- (2) Добавьте 800 мкл буфера для разведения образца «**Sample dilution buffer**» (F) и 100 мкл АТФ удаляющего реагента «**ATP releasing reagent**» раствор (D¹) в тестируемую трубу.
- (3) Перемешайте содержимое тестируемой трубы. Возьмите из нее 100 мкл содержимого и перенесите в другую трубу, для измерения. Оставьте образец при комнатной температуре на 30 минут для удаления АТФ из соматических клеток (из микробных клеток АТФ на данном этапе не удаляется).
- (4) Добавьте 100 мкл АТФ выделяющего реагента «**ATP releasing reagent**» (C) в тестируемую трубу и перемешайте, чтобы произошло хорошее выделение АТФ из микробных клеток.
- (5) Добавьте 100 мкл биолюминесцентного реагента раствор (A¹) и немедленно произведите измерение уровня биолюминесценции на приборе Lumitester C-100/(Kikkoman Corporation №60907).

Примеры исследования молочной продукции см. ниже.



Подсчет количества микробных клеток (КОЕ), которые были обнаружены по данной методике, основан на сравнении соотношения между количеством АТФ и числом КОЕ, полученном ранее в соответствии с традиционной методикой подсчета.

Внимание

Не допускать попадания реагентов набора на кожу и в глаза. В случае попадания в глаза или на кожу немедленно смыть водой и обратиться к врачу.

Хранить в месте, специально предназначенном для реагентов, защищенном от контакта с детьми. Не допускать контаминации реагентами и исследуемыми образцами пищи или пищевой продукции.