

エンドスペシー® ES-50Mセット トキシカラー® LS-50Mセット パイロカラージアゾ試薬 DIA150-MP

エンドトキシン試験法は、グラム陰性菌由来のエンドトキシン(以下、Etと略記)がカプトガニ(*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*等)の血球抽出成分LAL(Limulus Amebocyte Lysate)を活性化し、ゲル化を引き起こす反応に基づいています。この反応は逐次的な酵素反応によって起こることから、酵素による合成基質の加水分解により生ずる発色を指標とした比色法が開発されました。

エンドスペシー® ES-50Mセットおよびトキシカラー® LS-50Mセットは、比色法によるエンドトキシン定量のための試薬セットで、*Limulus polyphemus*から調製したライセートと発色合成基質(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)を構成成分としたLAL試薬、LAL試薬溶解用の緩衝液および蒸留水(Et, β-グルカンフリー)より構成されています。

エンドスペシー® ES-50Mセットは、偽陽性物質[(1→3)-β-D-グルカン構造を有するものとして、真菌多糖、セルロース系分離膜の洗浄液等]*1と反応することなく、エンドトキシンにのみ特異的に反応するように構築されています。

トキシカラー® LS-50Mセットは、エンドトキシンに反応するC因子系と(1→3)-β-D-グルカンに反応するG因子系を有しますが、検体中に(1→3)-β-D-グルカン構造を有する偽陽性物質が含まれないことが確認された場合や偽陽性物質の存在が問題とされない場合は、本セットの使用をお勧めします。

*1(1→3)-β-D-グルカンの測定には弊社販売のGlucateLL® Kitの使用を推奨します。

【特長】

- ・日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠した測定が可能です。
- ・エンドトキシンの高感度測定ができます。
- ・マイクロプレートを用いたカイネティック比色法とエンドポイント比色法のいずれの測定法にも使用できます。
- ・エンドスペシー® ES-50Mセットは、エンドトキシンにのみ特異的に反応します。
- ・多検体測定に便利なマルチタイプ包装となっています。

【必要な器具】

Et, β-グルカンフリー器具

器具	推奨器具名	コード番号
シリンジ	トキシペットディスペンサー用シリンジ	900520
チップ	トキシペットチップ200	900540
	トキシペットチップ1000	900545
マイクロプレート	トキシペットプレートLP	900570
アルミ箔	乾熱滅菌アルミ箔	800804

その他の必要器具

器具	推奨器具名	コード番号
マイクロプレートリーダー	ウェルリーダーMP-96	900625
ホットプレート*2		
プレートミキサー*2		
試験管ミキサー	試験管ミキサーTM-251	900675

*2ウェルリーダーMP-96を使用する場合は必要ありません。

【セットの内容】

020150 エンドスペシー® ES-50Mセット *3	50回用
③緩衝液	2.8 mL × 1本
④LAL試薬(C系ライセート)	1本
⑤蒸留水(Et, β-グルカンフリー)	2.8 mL × 1本

*3エンドトキシン特異的

020130 トキシカラー® LS-50Mセット	50回用
③緩衝液	2.8 mL × 1本
④LAL試薬	1本
⑤蒸留水(Et, β-グルカンフリー)	2.8 mL × 1本

* 010145 パイロカラージアゾ試薬DIA150-MP (マイクロプレート, エンドポイント比色法用)	150回用
(1A)塩酸溶液(試薬(1)溶解用)	4.0 mL × 2本
(1) 亜硝酸ナトリウム	1.65 mg × 2本
(2) スルファミン酸アンモニウム(アミド硫酸アンモニウム)	12 mg × 2本
(3) N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩	2.8 mg × 2本
(3A)N-メチル-2-ピロリドン溶液(試薬(3)溶解用)	4.0 mL × 2本

【貯法・有効期限】

貯法: 2~8℃、遮光保存(禁・凍結)

有効期限: 外箱に記載

※※【別売品】

010020 Control Standard Endotoxin (パイロクロム用)

010290 LRW (LAL Reagent Water)

【試薬の調製】

LAL試薬の調製:

エンドスペシー® ES-50Mセットまたはトキシカラー® LS-50Mセットの④LAL試薬のバイアルに③緩衝液の全量(2.8 mL)をディスペンサー用シリンジ(Et, β-グルカンフリー)等で加え、乾熱滅菌アルミ箔で蓋をし、泡立たないように混和溶解します(試験管ミキサーは泡立ちを起こす原因となるので使用しないでください)。

LAL試薬は使用直前に調製し、完全に溶解していることを確認してください(通常5分間程度で溶解します。白濁が消え、透明の溶液になります)。

LAL試薬は用時開封、用時調製して1回で使い切りとします。

標準液の調製と保存:

日本薬局方に基づくエンドトキシン試験には、標準品として、日本薬局方エンドトキシン標準品を使用し、その調製法および保存法に従ってください。

※※別売標準液の調製:

Control Standard Endotoxin(パイロクロム用)のバイアルにLRW 5.0 mLをトキシペットチップ1000(Et, β-グルカンフリー)等で加え、乾熱滅菌アルミ箔を被せ、アルミ箔に液が触れないよう注意して、試験管ミキサーで少なくとも1分間激しく攪拌します(使用直前に再度激しく攪拌)。その後、LRWで適切に希釈し、必要なエンドトキシン濃度にしてください。

※別売標準液の濃度:

使用するエンドスペシー® ES-50Mまたはトキシカラー® LS-50MならびにControl Standard Endotoxin(パイロクロム用)のロットの組み合わせごとに、米国薬局方エンドトキシン標準品で評定したControl Standard Endotoxinの力価(EU/ng)を示した試験成績書を当社ウェブサイト(<http://www.lalbiz.com/>)から入手できます。この力価に基づき、エンドトキシン濃度を算出し、必要に応じてLRWで希釈します。

※別売標準液の保存:

標準液を保存する場合には乾熱滅菌アルミ箔を被せ、その周りをパラフィルムで封をして2~8℃で保存してください。

1週間安定です。

ブランク:

⑤蒸留水(Et, β-グルカンフリー)をそのままブランクとして使用します。

※ジアゾカップリング試薬の調製:

パイロカラージアゾ試薬DIA150-MPの(1)亜硝酸ナトリウムのバイアルに(1A)塩酸溶液の全量(4.0 mL)を、(2)スルファミン酸アンモニウムのバイアルに蒸留水4.0 mLを、(3)N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩のバイアルに(3A)N-メチル-2-ピロリドン溶液の全量(4.0 mL)をそれぞれ加え混和溶解させ、(1)液、(2)液、(3)液を調製します。

〔標準操作法によるブランク値および定量範囲〕

(標準操作法における反応温度は37℃、反応時間は30分です。)

ブランク値

カイネティック比色法: 吸光度変化率 1.00 mAbs/min以下

エンドポイント比色法: 吸光度 0.100 Abs以下

※検出限界

0.001 EU/mL未満

定量範囲(実数日盛法による測定法)

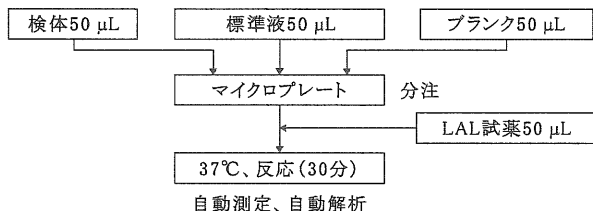
カイネティック比色法: 0.002~0.1 EU/mL

エンドポイント比色法: 0.002~0.1 EU/mL

〔標準操作法〕

I. マイクロプレートを用いたカイネティック比色法

1. 検体、標準液およびブランクのそれぞれ50 μLをマイクロプレート(Et, β-グルカンフリー)のウェルにチップ(Et, β-グルカンフリー)等で分注します。
2. 調製したLAL試薬をディスペンサー用シリンジ(Et, β-グルカンフリー)等で検体、標準液、ブランクが分注されたウェルにそれぞれ50 μL加えます。
3. マイクロプレートに蓋を被せ、ウェルリーダーにセットします。攪拌後、37℃で測定[測定波長405 nm(対照波長492 nm)]が開始され、反応終了後自動的に検体中のEt濃度が算出されます。なお標準反応時間は30分です。



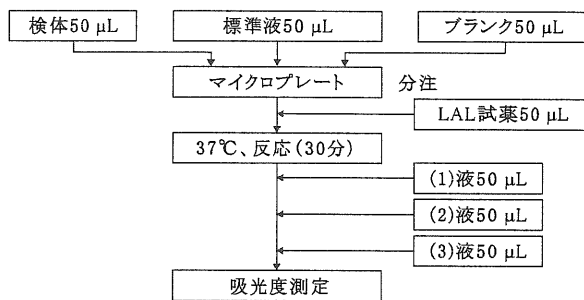
※II. マイクロプレートを用いたエンドポイント比色法

1. 検体、標準液およびブランクのそれぞれ50 μLをマイクロプレート(Et, β-グルカンフリー)のウェルにチップ(Et, β-グルカンフリー)等で分注します。
2. 調製したLAL試薬をディスペンサー用シリンジ(Et, β-グルカンフリー)等で検体、標準液、ブランクが分注されたウェルにそれぞれ50 μL加えます。
3. マイクロプレートに蓋を被せ、プレートミキサーで攪拌後、ホットプレートで37℃、30分間加温します。
4. 加温終了後、直ちにパイロカラージアゾ試薬DIA150-MPより調製した(1)液を各ウェルに50 μLずつ添加し、マイクロプレートを十分振とうします。次に、(2)液を各ウェルに50 μLずつ添加し、マイクロプレートを十分振とうします。

最後に(3)液を各ウェルに50 μLずつ添加し、マイクロプレートを十分振とうします。

なお、4.の操作はEt, β-グルカンフリーの必要はありません。

5. 2波長測定可能なマイクロプレートリーダーにマイクロプレートをセットし、545 nm(対照波長630 nm)で吸光度を測定します。



※[使用上または取り扱い上の注意]

※この添付文書をよく読んでから使用してください。

1. 本セットは、すべて研究用または試験用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれませんのでご注意ください。
2. 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法、使用目的以外での使用は保証いたしかねます。
3. 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
4. パイロカラージアゾ試薬DIA150-MPには塩酸溶液および亜硝酸ナトリウムが含まれていますので、取り扱いに注意してください。亜硝酸ナトリウムは消防法等で酸性物質に指定されています。製品安全データシート(MSDS)を準備しておりますのでご請求ください。
5. 試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当等を受けてください。
6. 試薬の開封後は、なるべく早く使用し、保存する場合は封をして指定の方法で保存してください。一度溶解したLAL試薬の保存については品質を保証いたしかねます。
7. バイアルのアルミキャップを取り外すときにはピンセット等をご使用ください。
8. 容器、付属品等の転用は保証いたしかねます。

※[文献]

- 1)宇佐美博幸: 昭医会誌, 45, 789-798, 1985
- 2)Obayashi, T. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 149, 55-65, 1985
- 3)Takada, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 175, 573-580, 1988
- 4)Tanaka, S. & Iwanaga, S.: limulus test for detecting bacteria endotoxins. *Methods in Enzymology*, 223, 358-364, 1993
- 5)田中重則, ほか: 人工臓器, 23, 1165-1173, 1994
- 6)田中重則: 透析液エンドトキシンがよくわかる本, 竹沢真吾編, 東京医学社, p.15-44, 1995
- 7)森田廣幸, ほか: 防菌防黴誌, 24, 467-475, 1996
- 8)田村弘志, ほか: エンドトキシン測定法の進歩, 第1回日本エンドトキシン研究会事務局, p.12-18, 1996
- 9)渡邊真紀, ほか: 臨牀透析別冊, 12, 149-158, 1996
- 10)Yamamoto, C. & Kim, S.T.: *Nephrology*, 2, 429-434, 1996
- 11)今村公亮, ほか: 臨牀透析別冊, 12, 159-164, 1996
- 12)金成泰編: 実践的アプローチ, 透析液水質管理&オンラインHDF, メディカルレビュー社, p.30-52, 1996
- 13)安武由美, ほか: 臨牀透析, 13, 759-763, 1997
- 14)相沢真紀, ほか: 腎と透析別冊, 55, 68-70, 2003
- 15)岡本まどか, ほか: 腎と透析別冊, 59, 283-285, 2005

※

発売元



生化学工業株式会社

〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1

Telephone:03-5220-8953

Facsimile :03-5220-8956

Endospecey[®] ES-50M Kit
Toxicolor[®] LS-50M Kit
PyroColor Diazo Reagents DIA 150-MP

Endotoxin test is based on the activation and gelation of LAL (Limulus Amebocyte Lysate), an extract of circulating amebocytes of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, etc.), by endotoxin (Et) derived from Gram-negative bacteria. Since this reaction occurs as a series of enzymatic reactions, a chromogenic assay has been developed which utilizes as the index a color that is developed as a result of the enzymatic hydrolysis of a synthetic substrate.

Endospecey[®] ES-50M Kit and Toxicolor[®] LS-50M Kit are reagent kits for chromogenic assay of endotoxin. Each kit consists of a LAL reagent comprising lysate of *Limulus polyphemus* and a synthetic chromogenic substrate (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA), a buffer solution for dissolving LAL reagent and distilled water (Et and β -glucan free).

Endospecey[®] ES-50M Kit is formulated so that it reacts specifically only with endotoxin without reacting with false-positive substances [substances having (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan structure, such as fungal polysaccharides and washings of cellulose-type filter membranes].

Toxicolor[®] LS-50M Kit contains both factor C system (which reacts with endotoxin) and factor G system (which reacts with (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan). If it is known that the sample does not contain false-positive substances with (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan structure*¹, or if presence or absence of pseudo-positive substances is not of concern, use of Toxicolor[®] LS-50M Kit is recommended.

*¹ For the measurement of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, we recommend the use of our product, Glucate[®] kit.

Characteristic features

- Conforms to Endotoxin Test of Japanese Pharmacopoeia.
- Offers a highly sensitive endotoxin assay.
- Applicable both to kinetic chromogenic assay using microplate and endpoint chromogenic assay.
- Endospecey[®] ES-50M Kit reacts specifically only with endotoxin.
- Supplied in multi packages convenient for multiple sample assay.

Lab wares required

Use the following recommended lab wares or those confirmed to be equivalent in material and function.

Et and β -Glucan free lab wares

Lab wares	Recommended lab wares	Code No.
Syringe	Toxipet Dispenser Syringe	900520
Tips	Toxipet Tip 200	900540
	Toxipet Tip 1000	900545
Microplate	Toxipet Plate LP	900570
Aluminum foil	Dry-heat sterilized aluminum foil	800804

Other lab wares required

Lab wares	Recommended lab wares	Code No.
Microplate reader	Wellreader MP-96	900625
Hot plate* ²		
Plate mixer* ²		
Test tube mixer	Test tube Mixer TM-251	900675

*² Not required if Wellreader MP-96 is used.

Components of each kit

020150 Endospecey [®] ES-50M Kit* ³	for 50 assays
③ Buffer	2.8 mL \times 1 vial
④ LAL reagent (factor C-pathway)	1 vial
⑤ Distilled water (Et and β -glucan free)	2.8 mL \times 1 vial

*³ Endotoxin specific

020130 Toxicolor [®] LS-50M Kit	for 50 assays
③ Buffer	2.8 mL \times 1 vial
④ LAL reagent	1 vial
⑤ Distilled water (Et and β -glucan free)	2.8 mL \times 1 vial

010145 PyroColor Diazo Reagents DIA150-MP	for 150 assays
(for endpoint colorimetry in microplates)	
(1A) HCl solution(for dissolving Reagent (1))	4.0 mL \times 2 vials
(1) Sodium nitrite	1.65 mg \times 2 vials
(2) Ammonium sulfamate (ammonium amidosulfate)	12 mg \times 2 vials
(3) <i>N</i> -(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	2.8 mg \times 2 vials
(3A) <i>N</i> -Methyl-2pyrrolidone solution (for dissolving Reagent (3))	4.0 mL \times 2 vials

Storage, expiry date

Storage: to be stored protected from light at 2 to 8°C (do not freeze)

Expiry date: indicated on the outer package

Options

- 010020 Control Standard Endotoxin (for Pyrochrome)
 010290 LRW (LAL Reagent Water)

Reconstitution of reagents

Reconstitution of LAL reagent:

Add the total volume (2.8 mL) of the buffer solution ③ to the vial of LAL reagent ④ of Endospecey[®] ES-50M Kit or Toxicolor[®] LS-50M Kit using a syringe (Et and β -glucan free), etc., cover the top of the vial with a sheet of aluminum foil (dry-heat sterilized), and mix and dissolve the content while avoiding foaming (do not use a test tube mixer since it causes foaming). Prepare LAL reagent immediately before use. Make sure that the reagent has dissolved completely. (Usually, it takes about 5 minutes to dissolve the reagent. While turbidity disappears and a clear solution is obtained.) LAL reagent should be unsealed and reconstituted before each use, and the reconstituted reagent should be for single use only.

Preparation and storage of standard solution:

For endotoxin tests conforming to Japanese Pharmacopoeia, use standard endotoxin (JP grade) as the standard and follow the procedures stipulated in the Pharmacopoeia for preparation and storage of standard solution.

Reconstitution of control standard solution:

Add 5.0 mL of LRW to the vial of Control Standard Endotoxin (for Pyrochrome) using a Toxipet tip 1000 (Et and β -glucan free) etc., cover the top of the vial with a sheet of aluminum foil (dry-heat sterilized), and mix the content vigorously using a test tube mixer for at least 1 minute while taking care so that the solution does not come contact with the aluminum foil. Then, make dilutions appropriately with LRW. Mix the content vigorously again immediately before use.

Concentration of the control standard solution:

Certificate of Analysis sheet indicating potency (EU/ng) of each lot of Control Standard Endotoxin standardized against USP-Reference Standard Endotoxin with each lot of Endospey ES-50M or Toxicolor LS-50M can be obtained on our website (<http://www.lalbiz.com/>). Based on the potency, calculate the endotoxin concentration in the reconstituted solution, and then make dilutions appropriately.

Storage of control standard solution:

For storing the standard solution, cover the top of the vial with a sheet of aluminum foil (dry-heat sterilized), seal the circumference with Parafilm, and store at 2 to 8°C. The standard solution is stable for 1 week.

Blank:

Use distilled water ⑤ (Et and β -glucan free) as the blank.

Preparation of diazo-coupling reagent:

Using the reagents supplied with the kit:

1. Add the total volume (4.0 mL) of HCl solution (1A) to the vial of sodium nitrite (1).
2. Reconstitute the vial of ammonium sulfamate (2) with 4.0 mL distilled water.
3. Add the total volume (4.0 mL) of *N*-Methyl-2-pyrrolidone solution (3A) to the vial of *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (3).
4. Mix and dissolve the contents by gently swirling the vials to prepare solutions (1), (2), and (3).

Blank value and assay range in standard assay procedure (The standard assay is carried out at 37°C for 30 minutes)

Blank value

Kinetic chromogenic: Change rate ≤ 1.00 mAbs/min

Endpoint chromogenic: Absorbance ≤ 0.100 Abs

Detection limit

< 0.001 EU/mL

Assay range (measurement by arithmetic scale)

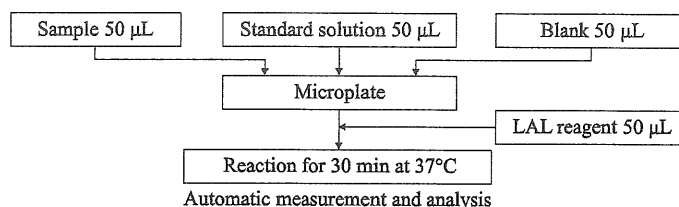
Kinetic chromogenic: 0.002 - 0.1 EU/mL

Endpoint chromogenic: 0.002 - 0.1 EU/mL

Standard assay procedure

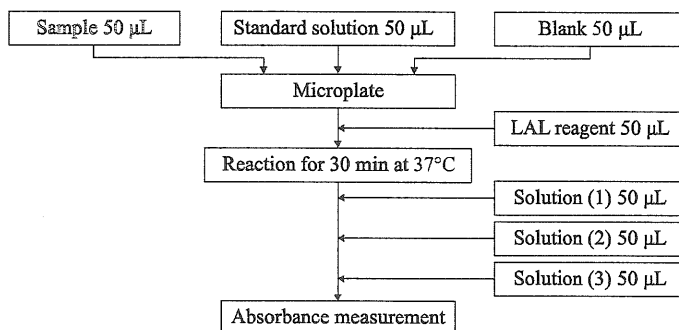
I. Kinetic chromogenic assay using a microplate

1. Transfer 50 μ L each of samples, standard solutions (serial dilutions) and the blank to wells of a microplate (Et and β -glucan free) using pipette tips (Et and β -glucan free).
2. Add 50 μ L of the reconstituted LAL reagent to each well containing the sample, standard solution or blank using a syringe (Et and β -glucan free).
3. Cover the microplate and place in a dedicated microplate reader. After stirring, measurement starts at 37°C [reading wavelength 405 nm, reference wavelength 492 nm] and Et concentrations in samples are calculated automatically after the reaction is completed. The standard assay reaction takes 30 minutes to complete.



II. Endpoint chromogenic assay using a microplate

1. Transfer 50 μ L each of samples, standard solutions (serial dilutions of Control Standard Endotoxin solution) and the blank to wells of a microplate (Et and β -glucan free) using pipette tips (Et and β -glucan free).
2. Add 50 μ L of the reconstituted LAL reagent to each well containing the sample, standard solution or blank using a syringe (Et and β -glucan free).
3. Cover the microplate, mix on a plate mixer, and incubate on a hot plate at 37°C for 30 minutes.
4. After assay incubation is completed, immediately add 50 μ L of Solution (1) to each well and gently shake the plate to mix. Promptly add solution (1) to all wells to ensure that all samples incubate for the same period of time. Add 50 μ L of Solution (2) to each well and shake plate to mix. Add 50 μ L of Solution (3) to each well and shake plate to mix. Full color (magenta) should develop immediately.
5. Place the microplate in a dual wavelength microplate reader and measure absorbance at 545 nm (reference wavelength 630 nm).



Precautions in use and handling

Please read this package insert carefully before using the kit.

1. All reagents contained in this kit are specified only for use in research and testing. It is not permitted to use them as pharmaceutical products, diagnostics or for any other purposes.
2. Use the kit according to the procedure described in the package insert. Use of the kit with procedures or for purposes other than described here cannot be guaranteed.
3. Do not use the reagent after its validity date has expired.
4. Since diazo-coupling reagent contains HCl solution and sodium nitrite, care should be exercised in handling the kit. Sodium nitrite is designated as an oxidative substance by Fire Service Law and other regulations. Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request.
5. If the reagent gets into eyes or mouth, get first aid such as washing off the reagent thoroughly and get medical help if necessary.
6. After opening the vial, use the reagent as soon as possible. When storing, seal the vial and store according to the method specified. The performance of stored reconstituted LAL reagent cannot be guaranteed.
7. Use forceps to remove the aluminum cap of vial.
8. Alternate use of containers and accessories is not guaranteed.



SEIKAGAKU CORPORATION
6-1, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo, Japan