

エンドスペシー® ES-24Sセット

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)がカブトガニ(*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-24S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)より構成されております。

エンドスペシー® ES-24S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。

*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。
- ・バイアルをそのまま反応用試験管として使い、シングルタイプの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。
- ・エンドトキシンにのみ特異的に反応します。
- ・測定に必要な本数だけ使用できるシングルタイプ包装となっておりますので試薬の無駄がありません。

【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
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
アルミ箔	乾熱滅菌アルミ箔	800804
アルミキャップ	乾熱滅菌アルミキャップ	800807

その他の必要器具

器具	推奨器具名	コード番号
比色計	EGリーダーSV-12*2 (カイネティック比色法)	900630
試験管ミキサー	試験管ミキサーTM-251	900675

*2EGリーダーSV-12を使用しない場合(エンドポイント比色法)は他に汎用比色計、恒温槽、氷-水浴槽が必要となります。

【セットの内容】

020170 エンドスペシー® ES-24Sセット	24回用
③緩衝液	2.8 mL × 4本
④LAL試薬(C系ライセート)	24本
⑤蒸留水(Et, β-グルカンフリー)	2.8 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)

010045 パイロカラージアゾ試薬DIA60-STV

(エンドポイント比色法に使用します。カイネティック比色法の場合は必要がありません。)

【試薬の調製】

LAL試薬の調製:

エンドスペシー® ES-24Sセットの④LAL試薬のバイアルに③緩衝液200 μLをチップ(Et, β-グルカンフリー)等に加え、乾熱滅菌アルミキャップで蓋をし、試験管ミキサーで2秒程度撹拌します。

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、速やかに測定を開始してください。

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)等に加え、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分間激しく撹拌します(使用直前に再度激しく撹拌)。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-24S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。

※別売ジアゾカップリング試薬の調製(エンドポイント-比色法用):

パイロカラージアゾ試薬DIA60-STVの(1)亜硝酸ナトリウムのバイアルに(1A)塩酸溶液の全量(12 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12 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蒸留水12 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 3.00 mAbs/min以下

エンドポイント-比色法: 吸光度 0.200 Abs以下

※※検出限界

0.001 EU/mL未満

定量範囲(実数目盛法による測定法)

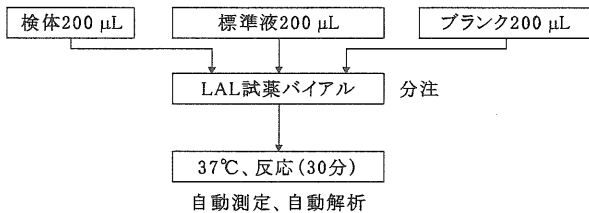
カイネティック-比色法: 0.002~0.1 EU/mL

エンドポイント-比色法: 0.002~0.1 EU/mL

[標準操作法]

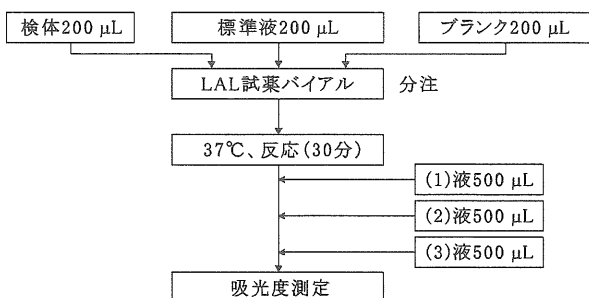
I. EGリーダーSV-12を用いたカイネティック-比色法

- 必要数の調製したLAL試薬のバイアルを準備します。
- 検体、標準液およびブランクのそれぞれ200 μLをLAL試薬のバイアルにチップ(Et, β-グルカンフリー)等に加え、試験管ミキサーで2秒程度攪拌します。
- LAL試薬をEGリーダーSV-12にセットします。
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. 汎用比色計を用いたエンドポイント-比色法

- 必要数の調製したLAL試薬のバイアルを氷-水浴槽に準備します。
- 検体、標準液およびブランクのそれぞれ200 μLをLAL試薬のバイアルにチップ(Et, β-グルカンフリー)等に加え、試験管ミキサーで2秒程度攪拌します。
- LAL試薬のバイアルを恒温槽で、37℃、30分間加温します。
- 加温終了後、氷-水浴槽に移し、パイロカラージアゾ試薬DIA60-STVより調製した(1)液500 μLをLAL試薬のバイアルに添加し、試験管ミキサーで2秒程度攪拌します。
次に、(2)液500 μLをLAL試薬のバイアルに添加し、試験管ミキサーで2秒程度攪拌します。
最後に(3)液500 μLをLAL試薬のバイアルに添加し、試験管ミキサーで2秒程度攪拌します。
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。
蒸留水を対照として、波長545 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。

- 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。
- 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。
- 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- パイロカラージアゾ試薬DIA60-STV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化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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 容器、付属品等の転用は保証いたしかねます。

[文献]

- 宇佐美博幸: 昭医会誌, 45, 789-798, 1985
- Obayashi, T. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 149, 55-65, 1985
- Takada, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 175, 573-580, 1988
- Tanaka, S. & Iwanaga, S.: limulus test for detecting bacteria endotoxins. *Methods in Enzymology*, 223, 358-364, 1993
- 田中重則, ほか: 人工臓器, 23, 1165-1173, 1994
- 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
- 森田廣幸, ほか: 防菌防黴誌, 24, 467-475, 1996
- 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
- 渡邊真紀, ほか: 臨牀透析別冊, 12, 149-158, 1996
- Yamamoto, C. & Kim, S.T.: *Nephrology*, 2, 429-434, 1996
- 今村光亮, ほか: 臨牀透析別冊, 12, 159-164, 1996
- 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
- 安武由美, ほか: 臨牀透析, 13, 759-763, 1997
- 相沢真紀, ほか: 腎と透析別冊, 55, 68-70, 2003
- 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

Endospecy® ES-24S Kit

The 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.

Endospecy® ES-24S Kit is reagent kit for chromogenic assay of endotoxin. The 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).

Endospecy® ES-24S 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].*¹

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

Characteristic features

- Conforms to Endotoxin Test of Japanese Pharmacopoeia.
- Offers a highly sensitive endotoxin assay.
- Applicable both to single-type kinetic chromogenic assay using the vials as the reaction test tube and to endpoint chromogenic assay.
- Endospecy® ES-24S Kit reacts specifically with endotoxin only.
- Supplied in single packages permitting the use of the minimum amount of reagent required thus eliminating wastes.

Lab wares required

Et and β -Glucan free lab wares

Lab wares	Recommended lab wares	Code No.
Tips	Toxipet Tip 200	900540
	Toxipet Tip 1000	900545
Aluminum foil	Dry-heat sterilized aluminum foil	800804
Aluminum caps	Dry-heat sterilized aluminum caps	800807

Other lab wares required

Lab wares	Recommended lab wares	Code No.
Colorimeter	EG Reader SV-12* ² (for kinetic chromogenic assay)	900630
Test tube mixer	Test tube Mixer TM-251	900675

*² If EG Reader SV-12 is not used (endpoint chromogenic assay), a general purpose colorimeter, a thermostat, bath and an ice-water bath are required.

Components of kit

020170 Endospecy® ES-24S Kit	for 24 assays
③ Buffer	2.8 mL \times 4 vials
④ LAL reagent (factor C-pathway)	24 vials
⑤ Distilled water (Et and β -glucan free)	2.8 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)
- 010045 PyroColor Diazo Reagents DIA60-STV (required for endpoint chromogenic assay but not for kinetic chromogenic assay)

Reconstitution of reagents

Reconstitution of LAL reagent:

Add 200 μ L of the buffer solution ③ to the vial of LAL reagent ④ contained in Endospecy® ES-24S Kit using a syringe (Et and β -glucan free), etc., cover the top of the vial with an aluminum cap (dry-heat sterilized), and mix about 2 seconds with a test tube mixer and dissolve the content while avoiding foaming. Prepare LAL reagent immediately before use. Make sure that the reagent has dissolved completely. 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 Endospecy 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 -D-glucan free) as the blank.

Preparation of diazo-coupling reagent:

Using the reagents supplied with the kit:

1. Add the total volume (12.0 mL) of HCl solution (1A) to the vial of sodium nitrite (1).
2. Reconstitute the vial of ammonium sulfamate (2) with 12.0 mL distilled water.
3. Reconstitute the vial of *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (3) with 12.0 mL of distilled water.
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 ≤ 3.00 mAbs/min

Endpoint chromogenic: Absorbance ≤ 0.200 Abs

Detection limit

< 0.001 EU/mL

Assay range (measurement by arithmetic scale)

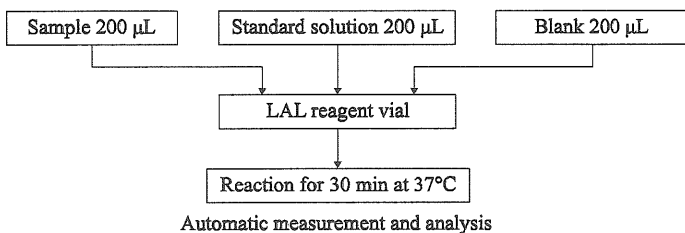
Kinetic chromogenic: 0.002 - 0.1 EU/mL

Endpoint chromogenic: 0.002 - 0.1 EU/mL

Standard assay procedure

I. Kinetic chromogenic assay using EG Reader SV-12

1. Prepare the required number of vials containing reconstituted LAL reagent.
2. Transfer 200 μ L each of samples, standard solutions (serial dilutions) and the blank to vials containing LAL reagent using pipette tips (Et and β -glucan free) and stir on a test tube mixer about 2 seconds.
3. Place the LAL reagent vials in an EG Reader SV-12. 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.



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

II. Endpoint chromogenic assay using general purpose colorimeter

1. Prepare the required number of vials containing reconstituted LAL reagent and immerse them in an ice-water bath.
2. Transfer 200 μ L each of samples, standard solutions (serial dilutions) and the blank into vials containing reconstituted LAL reagent using pipette tips (Et and β -glucan free) and stir on a test tube mixer about 2 seconds.
3. Incubate LAL reagent vials in a thermostat bath at 37°C for 30 minutes.
4. After assay incubation is completed, immediately add 500 μ L of Solution (1) to each tube and vortex 2 seconds to mix. Promptly add solution (1) to all tubes to ensure that the samples reactions incubate for the same period of time. Add 500 μ L of Solution (2) to each tube and vortex 2 seconds to mix. Add 500 μ L of Solution (3) to each tube and vortex 2 seconds to mix. Full color (magenta) should develop immediately. The procedures need not be Et and β -glucan free. Measure absorbance at 545 nm using distilled water as the reference.

