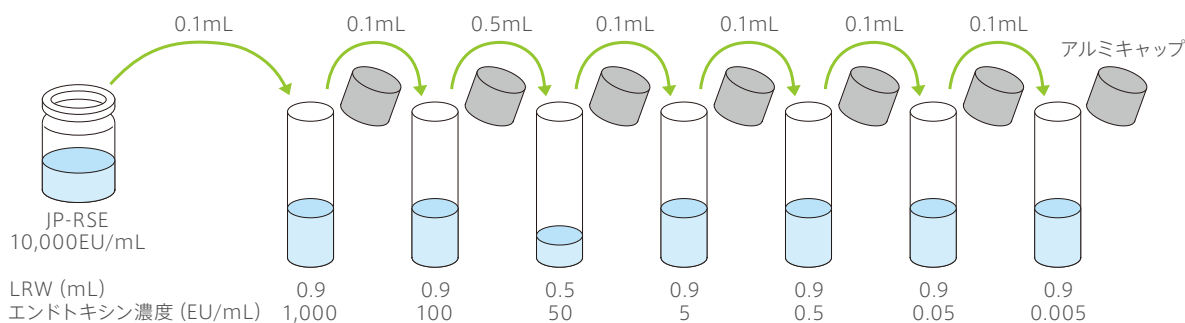


■ 予備試験

1 検量線の信頼性確認試験

1-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (1) エンドトキシン標準原液 (10,000 EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
 - (2) LRWを用いて10倍段階希釈を2回繰り返し、100 EU/mLを調製後、2倍希釈し、50 EU/mLを調製する。
 - (3) さらに、10倍段階希釈を4回繰り返し、エンドトキシン標準溶液 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) を調製する。
- ・ 段階希釈では各1分間試験管ミキサーで攪拌してください。



添加量 (mL)	エンドトキシン 濃度 (EU/mL)								
	10,000	1,000	100	50	5	0.5	0.05	0.005	
JP-RSE		0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
LRW		0.9	0.9	0.5	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

検量線作成に使用

1-2 各試料のプレートへの分注

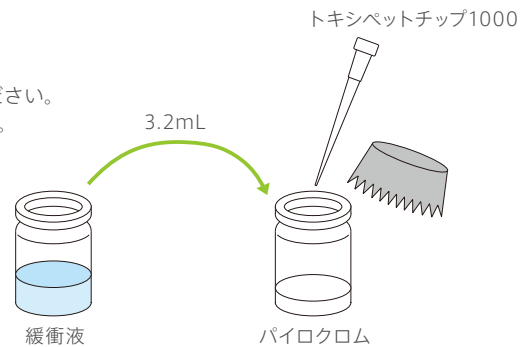
- (1) LRWおよび1-1で調製したエンドトキシン標準溶液 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) の各0.05 mLずつをプレートの所定のウェルに分注する (ウェルパターン例参照)。
- ・ 調製後のエンドトキシン標準溶液は使用直前に10秒間攪拌してください。
 - ・ 陰性対照として同時にLRWを測定することをおすすめします。
 - ・ 試料の分注後、ただちにプレートに蓋をかぶせてください。

ウェルパターン例：予備試験 (検量線の信頼性確認試験)

blk: LRW
St1~St5: エンドトキシン標準溶液

1-3 ライセート試液の調製

- (1) パイロクロムのバイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とす。
- (2) ピンセットを使って栓を無菌的に持ち上げ、真空状態を解除する。栓は廃棄する。
- (3) パイロクロム添付の溶解用緩衝液3.2mLをトキシベットチップ1000で加え、バイアルの口に乾熱滅菌アルミ箔をかぶせる。
- (4) 手でゆっくり円を描くように間欠的に攪拌する。
 - ・ 溶解用緩衝液の吸引・吐出はゆっくりと行ってください。
 - ・ 試験管ミキサーは泡立ちの原因になりますので、使用しないでください。
 - ・ 凍結乾燥粉末が完全に溶解するまで少なくとも5分程度かかります。
 - ・ 調製後は2~8°Cで保存し、8時間以内に使用してください。



1-4 ライセート試液の添加および測定

- (1) 完全に溶解したライセート試液 0.05mLをシリンジで所定のウェルに添加する。
- (2) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーアドバンスにセットする。
- (3) **測定** ボタンをクリックすると、直ちに1分間攪拌され、あらかじめ設定した測定条件で自動的に測定が開始される。
 - ・ ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.25をご参照ください。

1-5 データ解析

- (1) 測定終了後、ファイルは自動的に保存される。
 - ・ Software for Wellreader, DIエディションであらかじめ設定した解析条件で、自動解析されます。

1-6 判定

- (1) **検量線の表示** ボタン - **検量線の情報** ボタンをクリックし、作成した検量線の相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が0.980以上であることを確認する。

2 反応干渉因子試験

2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (1) 検量線の信頼性確認試験 : 1-1 エンドトキシン標準溶液の調製に従い、エンドトキシン標準溶液 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) を調製する。

2-2 2倍濃度試料溶液の調製

例 : 10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。

- (1) エンドスピーシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法 (反応速度法) : 2-2 2倍濃度試料溶液の調製 (p.20参照) に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。

2-3 試料添加用エンドトキシン標準溶液の調製

検量線の midpoint 濃度 (または midpoint 付近濃度) のエンドトキシンの2倍濃度溶液 (1EU/mL) を調製します。検量線用に調製したエンドトキシン標準溶液から試料添加用エンドトキシン標準溶液を調製します。

- (1) 試験管にLRW 0.4mLを入れる。
- (2) 2-1 で調製した5EU/mLエンドトキシン標準溶液を試験管ミキサーで1分間攪拌後、0.1mLを (1) の試験管に加え、1分間攪拌する。

