

FUJIFILM**Wako**

Code No. 297-96801

LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit

[Product information]

Code No.	Product name	Size	Storage
297-96801	LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set	96 Tests	-20°C
298-36991	LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells	96 Tests	-80°C

[Introduction]

This kit is used to detect pyrogen contamination in injectable pharmaceuticals and medical devices. This product utilizes a reporter assay system instead of the conventional ELISA system. The kit's very simple operation consists of adding luciferase substrate directly to cells that have been incubated with the samples to be tested. This unique procedure can reduce the risk of human errors and variation between tests. In addition, the assay is serum-free and is able to achieve constant performance independent of serum quality. The incubation time of the samples is only three hours, allowing for results to be obtained quickly. LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit can detect a variety of non-endotoxin pyrogens as well as endotoxin.

[Assay principle]

This kit uses a monocytic cell line NOMO-1 in which a luciferase reporter gene is introduced to express luciferase protein in response to NF- κ B signals activated by exposure to pyrogens. Because the expressed luciferase generates luminescence by reacting with the substrate, luminescence can be detected by a luminescence microplate reader to identify pyrogens in the tested samples.

[Product components]

LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set

Component name	Size
Assay medium	20 mL
Dilution medium	100 mL
Luciferase assay buffer	12 mL
Luciferase substrate	240 μ L

LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells

Component name	Size
LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells	350 μ L

For single use only.

[Other reagents and instruments required]

- Safety cabinet
- CO₂ incubator
- Water bath
- Vortex mixer
- Electronic pipette controller and 10 mL disposal pipette, sterile, pyrogen-free
- Micropipette
- 200 μ L pyrogen-free tip
[BioCleanTip Wako™ Extend S II (#294-35011)]
- 1000 μ L pyrogen-free tip
[BioCleanTip Wako™ 1000 II (#298-35031)]
- Electronic multi-dispenser pipette [Eppendorf Multipette® E3 or equivalent] and 5 mL disposal pipette, sterile, pyrogen-free
- Pyrogen-free glass tube
[Depyrogenated Dilution Tube (#DL-13100)]
- Aluminium Cap [Aluminium Cap-S (#293-28251)]
- Pharmacopeial standard endotoxin
- Water for bacterial endotoxin test
[Lysate Reagent Water, 30 mL (#LRW-2030)]
- Ethanol for disinfection
- 15 mL centrifuge tube, sterile, pyrogen-free
[Sumitomo Bakelite (#MS-56150) or equivalent]
- 96 well cell culture white plate
[Nunc™ 96 well flat bottom (#136101)]
- *In case using a plate other than the recommended one, confirm that the plate has no influence to assay in advance.
- Centrifuge
- Luminescence microplate reader

[Precautions]

- Both LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells and LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set are necessary for assay.
- LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells is very temperature sensitive product. Temperature increase in frozen condition significantly damage assay sensitivity. Store it in a -80°C or lower freezer immediately after receiving the product. When moving the product, put into a box of crashed-dry ice to cover the cell container with dry ice and avoid exposure to room temperature.
- LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells are human derived, and gene modified cells. Handle these following the applicable regional, national, and local laws as well as regulations.
- This assay responds very sensitively to pyrogens. Contamination with microorganisms or pyrogens from the environment or procedure may lead to incorrect results. Use care and attention to ensure no contamination.
- The reaction of LumiMAT™ may be influenced by samples to be tested. Check the influence of the test samples before testing if necessary.
- This product is for single use only. Use all the reagents once they are opened. The performance is not guaranteed if the cells are used after culture growth. Be sure to use the cells immediately after thawing.

- It is recommended to regularly calibrate the luminescence microplate reader following the manufacturer's manual.
- Do not administrate the products to any living things.
- Follow your institute's safety manual and use appropriate safety precautions.
- Use appropriate personal protective equipment including protective gloves and protective eyeglasses.
- Disposal should be in accordance with applicable regional, national, and local laws and regulations by referring to the Safety Data Sheet.

【Assay procedure】

1. Preparation before assay

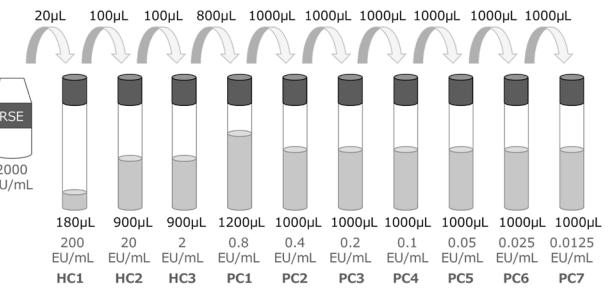
- (1) Thaw Dilution medium in advance (4°C over night or 37°C 1 hour). Store the thawed Dilution medium at 4°C until use.
- (2) Warm water bath to 37°C.
- (3) Warm Assay medium in a water bath for about 15 minutes.

2. Preparation of reference standard endotoxin

- (1) Reconstitute reference standard endotoxin to make 2000 EU/mL of solution by following the supplier's instruction.
- (2) Dilute the reference standard endotoxin solution with Dilution medium. The following table is an example dilution series. Use pyrogen-free vials which endotoxin do not adsorb for standard dilution.

Tube name	Solution	Endotoxin concentration
HC1	20 μL Reference Standard + 180 μL Dilution medium	200 EU/mL
HC2	100 μL HC1 + 900 μL Dilution medium	20 EU/mL
HC3	100 μL HC2 + 900 μL Dilution medium	2 EU/mL
PC1	800 μL HC3 + 1200 μL Dilution medium	0.8 EU/mL
PC2	1000 μL PC1 + 1000 μL Dilution medium	0.4 EU/mL
PC3	1000 μL PC2 + 1000 μL Dilution medium	0.2 EU/mL
PC4	1000 μL PC3 + 1000 μL Dilution medium	0.1 EU/mL
PC5	1000 μL PC4 + 1000 μL Dilution medium	0.05 EU/mL
PC6	1000 μL PC5 + 1000 μL Dilution medium	0.025 EU/mL
PC7	1000 μL PC6 + 1000 μL Dilution medium	0.0125 EU/mL

HC : High Concentration, PC : Positive Control



3. Sample preparation

Dilute samples not exceeding the maximum dilution factor (MVD) as calculated by the following expression.

$$\text{MVD} = (\text{CLC} \times \text{C}) / \text{Test Sensitivity}$$

- CLC : Contaminant limit concentration (EE/mg)

- C : Concentrations of test solutions (mg/mL)

- Test sensitivity : The lowest endotoxin reference standard concentration on the standard curve.

The CLC is the specified contaminant limit concentration for a product ; if unknown, it can be calculated using the following expression :

$$\text{CLC} = \text{K}/\text{M}$$

- K : Threshold pyrogenic dose per kilogram of body mass (EE/kg)

Administration method ① Intravenous : 5 EE/kg

② Intravenous(radioactive) : 2.5 EE/kg

③ Intrathecal : 0.2 EE/kg

- M : Maximum recommended bolus dose of product per kilogram of body mass

4. Transfer to plate

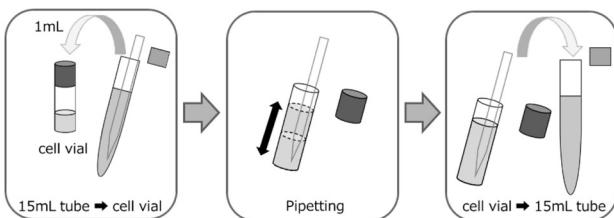
Add 50 μL of each solution prepared in steps 2 and 3 to a 96-well white plate. An example of the plate layout is shown below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank (Dilution medium)				Sample 1				Sample 9			
B	PC 7				Sample 2				Sample 10			
C	PC 6				Sample 3				Sample 11			
D	PC 5				Sample 4				Sample 12			
E	PC 4				Sample 5				Sample 13			
F	PC 3				Sample 6				Sample 14			
G	PC 2				Sample 7				Sample 15			
H	PC 1				Sample 8				Sample 16			

5. Reporter cell seeding

- (1) Add 9.5 mL of pre-warmed Assay medium to a 15 mL centrifuge tube.
- (2) Thaw LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells in a 37°C water bath for 1 minute by gently swirling the vial. Take out the vial from the water bath when a small crump of ice remains.
- (3) Add 1 mL of Assay medium from step “(1)” to the cells, then mix by pipetting.

- (4) Transfer all the cell suspension to the 15 mL centrifuge tube prepared in step "(1)".



- (5) Centrifuge the cells at 300 g for 5 minutes.
 (6) Remove the supernatant and suspend the cell pellet with 5.5 mL of Assay medium.
 (7) Add 50 μ L of cell suspension to each well in which standard/sample were dispensed.
 * Electronic multi-dispenser pipette is recommended over multi-channel pipette to minimize the variances among wells (Dispensing speed : 4 for Eppendorf Multipette® E3).

6. Incubation

Incubate the plate for 3 hours in a 37°C, 5% CO₂ incubator.

7. Measurement

- (1) Add all of Luciferase substrate to Luciferase buffer and mix by inverting the vial. Bring Luciferase buffer to room temperature before use.
 (2) Add 100 μ L of the mixed solution to each well.
 * Electronic multi-dispenser pipette is recommended over multi-channel pipette to minimize the variances among wells (Dispensing speed : 4 for Eppendorf Multipette® E3).
 (3) Measure the luminescent value with a luminescence microplate reader.

8. Calculation

Toximaster™ FQC1 Software for LumiMAT™ (sold separately) can be used for analysis. See the Toximaster™'s instruction manual for guidance on analysis by Toximaster™.

Calculate the pyrogen concentration as Endotoxin Equivalents (EE)/mL by comparing the luminescent value of the samples with the luminescent value of the reference standard endotoxin.

1. Plot the concentration of reference standard endotoxin on the X axis and the luminescent value on the Y axis and create a four parameters logistic (4PL) standard curve.

$$Y = D + \frac{A - D}{1 + (X/C)^B}$$

A : Top
 B : Slope
 C : IC50
 D : bottom

2. Rearrange the expression above to the expression below, then substitute the luminescent values of the samples and calculate the "EE/mL" value.

$$X = C \times \{(A - Y) / (Y - D)\}^{(1/B)}$$

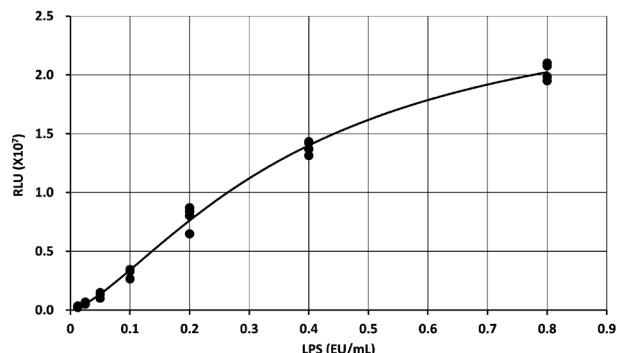
<calculation example>

$$A = 14732365, B = -1.3886, C = 0.37437, D = 61400, \text{luminescent value of sample} = 928030$$

$$X = 0.37437 \times \{(14732365 - 928030) / (928030 - 61400)\}^{(1/-1.3886)}$$

$$= 0.0510 \text{ (EE/mL)}$$

<Standard curve example>



【Assay procedure video】

An assay procedure video is available on the product web page. Access the web page from the QR code below or search for product code No. (297-96801) on the Fujifilm Wako web site at <https://labchem-wako.fujifilm.com>.



<License related notice>

* This product is patent pending.

* CHO-Spica cells were used to express protein used in this kit.

* NanoLuc® Technology is licensed from Promega Corporation. Licensed patents: U.S. Pat. No. 8557970 and U.S. Pat. No. 8669103, and all patents and patents pending which claim priority to the same priority application(s) as U.S. Pat. No. 8557970 and U.S. Pat. No. 8669103. NanoLuc® is a registered trademark of Promega Corporation.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshinachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : +81-6-6203-3741
 Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://fkw.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation 1600 Bellwood Road Richmond, VA 23237 U.S.A. Telephone : +1-804-271-7677 Facsimile : +1-804-271-7791 http://www.wakousa.com	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH Fuggerstrasse 12 D-41468 Neuss Germany Telephone : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 http://www.wako-chemicals.de
--	--

コードNo. 297-96801

LumiMATTM Pyrogen Detection Kit

【製品情報】

コード No.	製品名	容量	保存条件
297-96801	LumiMAT TM Pyrogen Detection Kit - Reagent Set	96 回用	-20°C
298-36991	LumiMAT TM Pyrogen Detection Kit - Cells	96 回用	-80°C

【はじめに】

本キットは、注射用医薬品や医療機器に混入・付着した発熱性物質を検出する製品です。本製品は、従来のELISAシステムとは異なったレポーター・アッセイ・システムを採用しています。試料と反応させた細胞の上から直接、発光基質を添加するだけの非常に簡便な操作であるため、ヒューマンエラーや試験間誤差を低減することができます。また、本試験には血清を使用しないため、血清由来の病原体曝露のリスクがなく、血清ロットに依存しない安定したアッセイが可能です。試料と細胞の反応時間はわずか3時間であり、短時間での試験を可能にしました。LumiMATTM Pyrogen Detection Kitは、エンドトキシンだけでなく、幅広い非エンドトキシン発熱性物質を検出することができます。

【反応原理】

本製品は、発熱性物質の曝露により活性化されるNF- κ Bシグナルに応答してルシフェラーゼタンパクを発現するシステムを単球細胞(NOMO-1細胞)に導入したレポーター細胞を使用します。3時間のインキュベーションで発現したルシフェラーゼ酵素に基質溶液を反応させることで得られる発光をプレートリーダーにて検出する事で、試料に含まれる発熱性物質を検出します。

【キット内容】

LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Reagent Set

試薬名	容量
細胞用培地	20mL
希釈用培地	100mL
発光アッセイバッファー	12mL
発光基質	240 μ L

LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Cells

試薬名	容量
LumiMAT TM Pyrogen Detection Kit - Cells	350 μ L

本製品は1回使い切りです。

【キット以外に必要な試薬・器具】

- ・安全キャビネット
- ・CO₂インキュベーター
- ・ウォーター・バス
- ・ボルテックスミキサー
- ・電動ピベッターと10mLディスポーザブルピベット(パイロ

ジェンフリー、滅菌)

- ・マイクロピベット
 - ・パイロジエンフリーチップ 200 μ L [パイオクリーンチップワコTM エクステンド S II (#294-35011)]
 - ・パイロジエンフリーチップ 1000 μ L [パイオクリーンチップワコTM 1000 II (#298-35031)]
 - ・電動連続分注器 [Eppendorf Multipette[®] E3など] と 5mL ディスポーザブルピベット(パイロジエンフリー、滅菌)
 - ・パイロジエンフリーガラスチューブ [Depyrogenated Dilution Tubes (#DL-13100)]
 - ・アルミキャップ [アルミキャップ-S (#293-28251)]
 - ・薬局方標準エンドトキシン(準拠する薬局方に応じて適切な標準エンドトキシンをご用意下さい)
 - ・エンドトキシン試験用水
 - ・消毒用エタノール
 - ・15mL 遠心管、パイロジエンフリー、滅菌 [住友ベークライト (#MS-56150) など]
 - ・96well 細胞培養用ホワイトプレート [NuncTM 96 ウェル平底 (#136101)]
- ※推奨品以外のプレートを使用する場合は、必ず事前に測定に影響がないことを確認の上でご使用下さい。
- ・遠心機
 - ・発光プレートリーダー

【注意】

- ・試験には LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Cells と、LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Reagent Set の両方が必要です。
- ・LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Cells は温度変化に敏感な製品です。冷凍保管時に温度上昇にさらされると、試験性能が著しく低下します。受取後は直ちに-80°C以下のフリーザーに保存して下さい。製品を移動する時は、細胞容器がクラッシュドライアイスに覆われるようにして、できる限り室温にさらされないようにご注意下さい。
- ・LumiMATTM Pyrogen Detection Kit - Cells は、ヒト由来の細胞です。Biological Safety Level 2でお取り扱い下さい。
- ・本製品は極めて鋭敏に発熱性物質に反応します。環境や手技に由来する微生物菌体や発熱性物質による汚染により、正しい結果が得られない場合がありますので、汚染には十分注意してご使用下さい。
- ・LumiMATTM の反応は試料により反応の促進や阻害などの干渉を受ける場合があります。必要に応じて反応干渉についてご確認の上でご使用下さい。
- ・本製品は使い切りです。開封後は速やかに使用して下さい。本品中の細胞を増殖して使用した場合の性能は保証いたしかねます。必ず細胞を解凍直後にご使用下さい。
- ・使用する発光プレートリーダーは、装置メーカーの説明書に従って定期的に校正することを推奨します。
- ・生物(ヒト、その他動物等)への投与は、決して行わないで下さい。
- ・実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して試験を行って下さい。
- ・実験手袋や保護メガネなどの保護具を着用して実施して下さい。
- ・試薬の廃棄は、SDSを参照し適切に行って下さい。

【使用方法】

1. 試験の準備

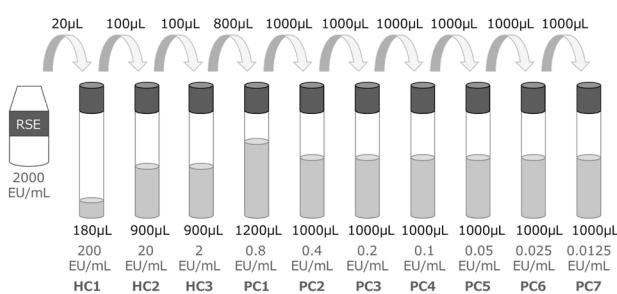
- (1) 予め希釈用培地を融解させて下さい (4°C、Over night もしくは 37°C、1 時間程度)。融解後の希釈用培地は 4°C で保管して下さい。
- (2) ウォーターバスを 37°C に温めて下さい。
- (3) 細胞用培地をウォーターバスにて 15 分程度温浴して下さい。

2. エンドトキシン標準品希釈系列の調製

- (1) 局方標準エンドトキシンを、2000EU/mL になるようにエンドトキシン試験用水で溶解して下さい。
標準エンドトキシンの取り扱いは、使用する標準品で指定された方法に従って下さい。
- (2) 局方標準エンドトキシン溶液 (2000EU/mL) を希釈用培地で希釈します。
以下に希釈系列作製方法の一例を示します。希釈にはエンドトキシンが吸着しないことが確認されたパイロジエンフリー容器を使用して下さい。

チューブ名	希釈内容	エンドトキシン濃度
HC1	20 μL 標準品 + 180 μL 希釈用培地	200EU/mL
HC2	100 μL HC1 + 900 μL 希釈用培地	20EU/mL
HC3	100 μL HC2 + 900 μL 希釈用培地	2EU/mL
PC1	800 μL HC3 + 1200 μL 希釈用培地	0.8EU/mL
PC2	1000 μL PC1 + 1000 μL 希釈用培地	0.4EU/mL
PC3	1000 μL PC2 + 1000 μL 希釈用培地	0.2EU/mL
PC4	1000 μL PC3 + 1000 μL 希釈用培地	0.1EU/mL
PC5	1000 μL PC4 + 1000 μL 希釈用培地	0.05EU/mL
PC6	1000 μL PC5 + 1000 μL 希釈用培地	0.025EU/mL
PC7	1000 μL PC6 + 1000 μL 希釈用培地	0.0125EU/mL

HC : High Concentration、PC : Positive Control



3. サンプルの調製

サンプルは、以下の計算式にて算出される最大希釈倍率 (MVD) を超えないように希釈して下さい。

希釈には、希釈用培地を使用して下さい。

$$MVD = (CLC \times C) / \text{Test Sensitivity}$$

- CLC : Contaminant limit concentration (EE/mg)
- C : 試料溶液の濃度 (mg/mL)
- Test sensitivity : 検量線の下限濃度

— 9/12 —

CLC は設定されたエンドトキシン規格値、もしくは K/M で計算して下さい。

- K : 発熱を誘導する 1kg あたりの発熱性物質量 (EE/kg)
 - 投与区分 ①静脈内 : 5EE/kg
 - ②静脈内 (放射性) : 2.5EE/kg
 - ③脊髄腔内 : 0.2EE/kg
- M : 体重 1kg あたり 1 時間以内に投与する最大量

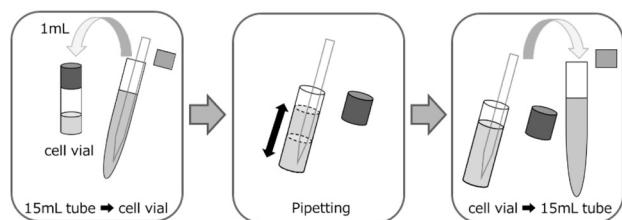
4. スタンダード及びサンプルの添加

手順 2 および 3 で調製した溶液を 96well ホワイトプレートに 50 μL ずつ添加して下さい。Blank には希釈用培地を使用して下さい。プレート配置の 1 例を以下に示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank (希釈用培地)		Sample 1						Sample 9			
B		PC 7		Sample 2					Sample 10			
C			PC 6		Sample 3				Sample 11			
D				PC 5		Sample 4			Sample 12			
E					PC 4		Sample 5			Sample 13		
F						PC 3		Sample 6		Sample 14		
G							PC 2		Sample 7		Sample 15	
H								PC 1		Sample 8		Sample 16

5. レポーター細胞の播種

- (1) 15mL 遠心管に 9.5mL の細胞用培地を添加して下さい。
- (2) ウォーターバスにて 1 分間 LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells を半融解して下さい。
- (3) 1mL の細胞用培地を (1) から分取して、半融解細胞液とビペッティングにて混ぜ合わせて下さい。
- (4) (3) の細胞懸濁液を (1) の遠心管に全量移して下さい。



- (5) 300g で 5 分間遠心して下さい。

- (6) 上清を除いて、5.5mL の細胞用培地で懸濁して下さい。

- (7) 50 μL ずつ、Positive Control およびサンプルを播種したプレートに添加して下さい。

※試験誤差を抑えるために、マルチチャンネルピペットではなく、電動連続分注器での分注を推奨します。排出速度 4 (Eppendorf Multipette® E3 の場合)。

6. インキュベーション

5%CO₂、37°C 環境下で 3 時間インキュベートして下さい。

7. 検出

- (1) 全量の発光アッセイバッファーと発光基質を混合して下さい。発光アッセイバッファーは室温に戻してから使用して下さい。

— 10/12 —

- (2) 100 μ L ずつ各 well に添加して下さい。
※試験誤差を抑えるために、マルチチャンネルピペットではなく、電動連続分注器での分注を推奨します。排出速度4 (Eppendorf Multipette[®] E3 の場合)。
- (3) 発光プレートリーダーにて発光値を測定して下さい。

8. 濃度計算

専用ソフトウェア ToximasterTM FQC1 Software for LumiMATTM (別売) を用いて解析が可能です。ToximasterTM の使用法は、ToximasterTM の製品説明書をご確認下さい。

エンドトキシン標準品の発光量と被験試料の発光量を比較して被験試料中の発熱物質濃度を Endotoxin Equivalents (EE)/mL として求めます。

- ①エンドトキシン標準品の濃度を X 軸に、発光値を Y 軸にプロットして 4PL (4 Parameter Logistic) 検量線を作成して下さい。

$$Y = D + \frac{A - D}{1 + (X/C)^B}$$

A : Top
B : Slope
C : IC50
D : bottom

- ②検量線式を以下のように変形した式に、発光値を代入して EE/mL を算出して下さい。

$$X = C \times \{(A - Y) / (Y - D)\}^{(1/B)}$$

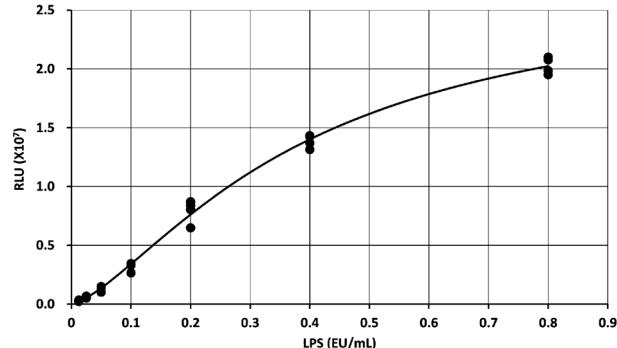
[例]

A = 14732365、B = -1.3886、C = 0.37437、D = 61400

サンプル発光値 = 928030 の場合は、

$$X = 0.37437 \times \{(14732365 - 928030) / (928030 - 61400)\}^{(1/-1.3886)} \\ = 0.0510 \text{ (EE/mL)}$$

[検量線例]



【操作法動画】

製品 Web ページより操作法動画をご覧いただけます。
下記 QR コードから直接アクセスするか、当社ホームページ <https://labchem-wako.fujifilm.com> にて、製品コード No. (297-96801) で検索して下さい。



<ライセンス関連>

※本製品は特許出願中です。

※製品の一部に CHO-Spica を用いて作製したタンパク質を使用しています。

※ NanoLuc[®] Technology is licensed from Promega Corporation. Licensed patents : U.S. Pat. No. 8557970 and U.S. Pat. No. 8669103, and all patents and patents pending which claim priority to the same priority application(s) as U.S. Pat. No. 8557970 and U.S. Pat. No. 8669103. NanoLuc[®] is a registered trademark of Promega Corporation.

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741