

Recombinant Factor C Endotoxin Detection Kit

重组 C 因子内毒素检测试剂盒

产品简介

已知，无论是生命科学研究还是生物制品生产，都会涉及到生物源材料的使用，其中包括来源于微生物、动物和人的细胞、组织、体液成分等。考虑到生产的药物的安全性，需要对起始物料、生产工艺、生产环境等进行严格监控，防止有细菌、真菌等微生物污染。细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁上的特有结构，细菌在存活状态时不释放出来，但会在细菌死亡后的裂解大量释放。微量的内毒素进入机体就能引起发热休克等严重反应，从而影响生物制品的安全性。2020 版《中国药典》（三部）针对细菌内毒素检测，收录了包括凝胶法和光度法在内的共 6 种细菌内毒素检查方法。

凝胶法和光度法等都需要从海洋节肢动物鲎中取鲎血作为原料，而鲎目前已呈濒危现状，亟需寻求替代方法。2020 版《中国药典》（四部）9251 章节中提到可以采用重组 C 因子法检测细菌内毒素（C 因子是鲎试剂中对细菌内毒素敏感的蛋白，能够选择性识别内毒素）。

本试剂盒通过基因重组的方式表达 C 因子，然后重组 C 因子被待测样本中的细菌内毒素激活，进而酶切水解荧光底物，产生与内毒素浓度成比例的荧光信号，根据荧光信号值检测内毒素含量。本试剂盒可以用于人类疾病治疗的注射药物（如化学药品、抗生素、生物制品等）和医疗器械（包括透析液、植入式器械等）的原辅料、研发和生产工艺过程以及商业化进程中的内毒素检测。

产品信息

货号	36723ES48 / 36723ES96
规格	48 T / 96 T

组分信息

组分编号	组分名称	36723ES48	36723ES96
36723-A	Bacterial Endotoxin Working Standard	1 vial	1 vial
36723-B	Bacterial Endotoxin Working Standard Dissolved Liquid	6 mL	6 mL
36723-C	Pyrogen-free Water	30 mL	30 mL
36723-D	Fluorogenic Substrate	3 mL	6 mL
36723-E	Measurement Buffer	2.5 mL	5 mL
36723-F	Recombinant Factor C (rFC) Enzyme Solution	0.6 mL	1.2 mL

储存条件

- 2~8°C 保存，有效期 1 年。开封后未使用完的试剂盒仍在 2~8°C 保存，有效期 1 个月。其中，36723-A 溶解后 2~8°C 储存。
- 收到货后，请检查共 6 个组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

使用说明

1. 实验前准备

1) 自备耗材和试剂：

- a. 无热原玻璃稀释管（用于内毒素工作标准品稀释）
- b. 无菌无热原的移液器、吸头、离心管
- c. 一次性无菌无热原 96 孔板

2) 自备设备和仪器：

- a. 37°C恒温箱
- b. 旋涡混匀仪
- c. 酶标仪（波长设置为 380/440 nm）

3) 实验环境准备

为确保实验结果的准确性，实验环境要求操作过程不引入额外的内毒素。因此，建议在开始实验前，先对实验室进行 30 min 紫外线消毒。如果不确定开放的实验室环境是否满足要求，可在超净工作台内进行实验操作，并提前清洁超净工作台，再打开超净工作台的紫外灯照射 30 min 以上。

2. 实验步骤

1) 制备待测样本

- a. 所有与待测样品或测试试剂直接接触的材料均应无热原。
- b. 待测样品的稀释要在无热原玻璃管中用无热原水进行，避免微生物或内毒素污染；若不及时检测，建议冷藏或冷冻保存。
- c. 待测样品的稀释倍数应小于待测样品的最大有效稀释倍数，待测样品最大有效稀释倍数（MVD）的计算公式如下：

$$\text{MVD} = \text{内毒素限度}^* (\text{EU/mL}) / \text{测定灵敏度}^* (0.005 \text{ EU/mL})$$

^{*}内毒素限度：未稀释样品中可接受的内毒素浓度最大值。

^{*}测定灵敏度：测定试剂的最低检测限度（本试剂盒的最低检测限度为 0.005 EU/mL）。

- d. 对内毒素检测无干扰[†]的样品可直接用于检测；对内毒素检测有干扰（增强或者抑制）的样品需稀释至不干扰检测的浓度，稀释过程应充分旋涡震荡 ≥ 2 min；通常内毒素检测干扰是由于样品中组分的浓度过高，因此大多数情况下，通过适度的稀释甚至调节 pH 值克服对内毒素检测的干扰。

[†]判断待测样品是否对内毒素检测有干扰，可考察待测样品内毒素检测的加标回收率，加标回收率在 50%~200%之间，即认为对检测没有干扰，加标回收率% = (内毒素浓度加标 - 内毒素浓度未加标) / 加标内毒素浓度 $\times 100\%$ 。

- e. 待测样品的 pH[†]需维持在 6~8 之间。若样品的 pH 值不在此范围内，则需要使用无内毒素的氢氧化钠、盐酸或其它缓冲溶液进行调节。

[†]待测样品不能直接进行 pH 调节，以免被 pH 电极污染内毒素导致假阳性，务必预实验考察适宜的 pH 调节方法。

2) 设置酶标仪

- a. 荧光信号设为相对荧光单位(RFU)，由于真实的荧光信号被转换为电子信号，该电子信号可使用增益设置或灵敏度设置进行调整，因此 RFU 是一种任意单位。

- b. 根据检测到的信号强度，可将仪器调整到更高的增益/灵敏度设置，以增强微弱信号，或者在信号太强时将仪器调低到较低的增益/灵敏度设置。

- c. 在 rFC 法进行内毒素检测的试验中，Log (Δ RFU)与 Log (内毒素浓度 EU/mL)相对应，如果灵敏度调得过低，将很难检测到最低标准的荧光；如果灵敏度调得过高，最高标准的荧光将超出检测范围。因此进行试验前，必须确定合适的检测灵敏度。

例如，FLx800TM 酶标仪的荧光范围是 0~99999。为了所有点的荧光都落在检测范围内，0.5 EU/mL 的 RFU 范围应为 1000~10000，对应 RFU 的对数范围为 3~4，对数中点是 3.5。因此，0.5 EU/mL 的目标绝对净 RFU 大约为 3000 RFU。为了让日常检测试验中的阴性对照与最低标准之间保持足够大的间隔，可将 3000 RFU 视为 0.5 EU/mL 内毒素浓度的最小值。

注：由于不同品牌酶标仪搭载的软件差异，建议用户参阅酶标仪用户手册中的使用说明。

3) 溶解内毒素工作标准品

- a. 向内毒素工作标准品冻干粉中加入产品标签对应体积的内毒素工作标准品溶解液，从而溶解内毒素工作标准品冻干粉，再漩涡震荡 ≥ 15 min。
- b. 加溶解液时，注意每次移液都要使用新的移液器吸头，以避免污染剩余试剂；配制后未使用的内毒素工作标准品可于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存一个月；再次使用配制后的内毒素工标准品，需平衡至室温后漩涡震荡 ≥ 15 min，方可用于检测。

4) 梯度稀释内毒素工作标准品

- a. 取 4 支一次性无热原玻璃管，在管子上标注内毒素工作标准品浓度（分别 0.005、0.05、0.5 及 5 EU/mL），使用无热原的水对溶解的内毒素工作标准品溶液进行稀释，以制备系列内毒素标准品溶液，建议以梯度稀释方法稀释内毒素工作标准品。可根据需要的浓度调整加入的稀释液，建议先将内毒素工作标准品稀释成 20 EU/mL 的浓度，再进行后续的梯度稀释。
- b. 由于内毒素会吸附于塑料管壁，请勿使用塑料管稀释内毒素；进行稀释前应将用于稀释的上一浓度内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡(1400 rpm) ≥ 2 min，如：在准备制备 5 EU/mL 内毒素标准品时，先将原始稀释的内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 ≥ 2 min；在制备 0.05 EU/mL 内毒素标准品时，先将 0.5 EU/mL 内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 ≥ 2 min；稀释后的内毒素标准品溶液需尽快使用。

稀释管	无热原水体积	加入的内毒素标准品和体积	终浓度
Std4	0.75 mL	0.25 mL (20 EU/mL)	5 EU/mL
Std3	0.9 mL	0.1 mL Std4	0.5 EU/mL
Std2	0.9 mL	0.1 mL Std3	0.05 EU/mL
Std1	0.9 mL	0.1 mL Std2	0.005 EU/mL
Std0	1 mL	0	0 EU/mL

表 1 不同浓度内毒素工作标准品配制体系

5) 加样至无菌无热原 96 孔板

- a. 向 96 孔板中先后加入 100 μL 的阴性对照（无热原水，即 Std0）、各浓度内毒素工作标准品、待测样品、待测样品加标（加入 10 μL 5 EU/mL 的内毒素标准品），每种样本做 2~3 个复孔。
- b. 每次实验均需进行内毒素工作标准溶液检测，绘制新的标准曲线；且建议每个样品均做加标。

下表为参考板位：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	标准曲线 Std0	标准曲线 Std0			待测样本 TS1	待测样本 TS1						
B	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1			待测样本 TS2	待测样本 TS2						
C	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2			待测样本 TS3	待测样本 TS3						
D	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3										
E	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4			样本加标 ERC1	样本加标 ERC1						
F					样本加标 ERC2	样本加标 ERC2						
G					样本加标 ERC3	样本加标 ERC3						
H												

表 2 上机参考板位

6) 底物制备

- a. 内毒素工作标准品溶液配制期间可同时配制底物试剂：提前 30 min 取出荧光底物溶液、测定缓冲液和 rFC 酶溶液，使各试剂温度平衡至室温。
- b. 配制底物试剂，按照 5:4:1 的比例混合荧光底物溶液、测定缓冲液和 rFC 酶溶液，轻轻地充分混合，切勿漩涡混合。
- c. 先后吸取荧光底物溶液、测定缓冲液和 rFC 酶溶液至配制容器中，确保 rFC 酶溶液最后加入；底物试剂请现配现用，切勿一次配制过多。下述为供参考的底物配制表：

测定孔数	荧光底物溶液(mL)	测定缓冲液(mL)	rFC 酶溶液(mL)	配制总体积(mL)
12	0.8 mL	0.64 mL	0.16 mL	1.6 mL
24	1.4 mL	1.12 mL	0.28 mL	2.8 mL
36	2 mL	1.6 mL	0.4 mL	4 mL
48	2.6 mL	2.08 mL	0.52 mL	5.2 mL
60	3.2 mL	2.56 mL	0.64 mL	6.4 mL
72	3.8 mL	3.04 mL	0.76 mL	7.6 mL
84	4.4 mL	3.52 mL	0.88 mL	8.8 mL
96	5 mL	4 mL	1 mL	10 mL

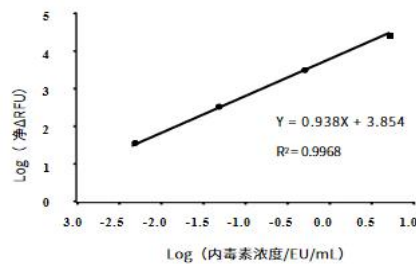
表 3 底物配制体系

7) 底物试剂加入 96 孔板并进行荧光检测

- 设置酶标仪检测参数：激发波长 380 nm，发射波长 440 nm。
- 使用移液器向上述所有样品孔中加入底物试剂，100 μ L /孔，移液时注意更换吸头，避免污染剩余试剂。
- 底物试剂加入后，立即读取 0 h 荧光值。
- 将 96 孔板放在 37°C \pm 1°C 的培养箱中，孵育 1 h 后进行 1 h 荧光值读数。

8) 数据分析

- 将酶标仪读取的荧光值（时间点 0 h 和 1 h）导出到 Excel 表。
- 所有孔的 1 h 荧光值中减去 0 h 荧光值 (Δ RFU)。
- 对标准品和待测样品 Δ RFU 数据减去阴性对照孔 Δ RFU，得到标准品和待测样品的净 Δ RFU 值。
- 计算内毒素工作标准品平均净 Δ RFU 和浓度 (EU/mL) 的对数。
- 以内毒素工作标准品溶液浓度的对数为横坐标，净 Δ RFU 的对数为纵坐标绘图并进行线性拟合， $\text{Log}(\text{净}\Delta\text{RFU})=A*\text{Log}(\text{内毒素浓度 EU/mL})+B$ ，标准曲线的相关系数 R^2 值应 \geq 0.98，示例如下图：



- 计算待测样品及样品加标的内毒素浓度，再计算加标回收率【加标回收率%=(内毒素浓度加标-内毒素浓度未加标)/加标内毒素浓度 0.5EU/mL \times 100%】，若加标回收率在 50%~200%之间则认为样品对检测无干扰，检测结果可靠。
- 对加标回收率合格的样品，根据样品的稀释倍数计算未稀释样品的内毒素浓度。

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估，具体可联系翊圣技术人员获得相应的性能验证报告。

本试剂盒性能经过充分评估，标曲范围为 0.005 EU/mL~5 EU/mL，板内精密度小于 10%，板间精密度小于 15%，准确度满足 75%~125%范围，检测限为 0.005 EU/mL。

注意事项

- 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书；
- 请在有效期内使用该产品，禁止不同批次的相关试剂进行混用；

- 3) 所有试剂在使用之前，均需要恢复至室温；
- 4) 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性；
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6) 本产品仅用作科研用途。