

Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL) (Gel Clot Assay, 0.125EU/mL)

鲎试剂(TAL) (凝胶法, 0.125EU/mL)

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。

本产品就是采用凝胶法对内毒素进行定性或者半定量检测的鲎试剂。由于,鲎试剂中含有C因子、B因子、凝固酶原和凝固蛋白原等。在适宜的条件下(如:温度、pH值及无干扰物质等),细菌内毒素能激活C因子,引起一系列酶促反应,使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶。

本鲎试剂为鲎科动物东方鲎血液中的变性细胞经裂解后提取到的一种细胞溶解物冻干品,其能与极微量的细菌内毒素形成特异性的凝胶反应,反应的速度和凝胶的坚固程度与内毒素浓度有关。

产品信息

货号	60454ES03 / 60454ES08 / 60454ES10
规格	1支/5支/10支

组分信息

组分编号	组分名称	60454ES03	60454ES08	60454ES10
60454-A	鲎试剂 (0.125 EU/mL, 0.1 mL/支)	1支	5支	10支

储存条件

2~8°C保存,有效期2年。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,仅供体外鲎试验检测,严禁用于人体。
2. 为了您的安全和健康,请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读说明书,实验应规范操作,包括细菌内毒素标准品溶解、稀释及加样。
4. 实验过程中所用的器皿需经处理,以去除可能存在的外源性内毒素,常用的方法是干热灭菌法(即250°C干烤≥30 min);也可以采用其他确保不干扰内毒素检查的方法。若使用塑料器械,应选用标明无内毒素并对试验无干扰的器械。试验操作过程应防止微生物的污染。
5. 需采用细菌内毒素国家标准品或工作标准品复核本鲎试剂的灵敏度值,应为标示值的50%~200%。
6. 本产品为一次性的试剂。

使用说明

1. 实验前准备

1) 提前准备实验所需试剂和耗材：

如：细菌内毒素工作标准品(Cat#60451ES)、细菌内毒素检查用水(Cat#60456ES10)、无热原吸头^{*}和无热原玻璃试管(Cat#60457ES)等。

^{*}推荐您购买翌圣生物 200 μ L 加长吸头盒装灭菌 (Cat#83051ES)、1000 μ L 盒装蓝色无菌吸头 (Cat#83080ES)。

2) 自备实验所需设备和仪器：

如：涡旋振荡器、250℃加热和干燥烘箱、移液器、恒温水浴锅或干式恒温金属浴(37±1℃)等。

2. 实验方法

1) 准备超净工作台：

提前 30 min 开启超净工作台，试验操作过程中不要开启风机，试验完毕后用 75%乙醇擦拭超净工作台。试验操作过程应防止微生物和细菌内毒素污染。

2) 溶解和稀释细菌内毒素标准品：

- 取 1 支细菌内毒素工作标准品（凝胶法检测用）(Cat#60451ES)，轻弹瓶壁使粉末落入瓶底，用砂轮在瓶颈上部划痕，用 75%乙醇擦拭后启开，避免玻璃屑落入瓶内。
- 按照工作标准品说明书，加入细菌内毒素检查用水溶解，封口膜封口，置漩涡混合器上混匀 15 min。然后加入细菌内毒素检查用水进行稀释，将其稀释成 2 λ 、 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 等一系列浓度的内毒素标准溶液（ λ 为鲎试剂灵敏度标示值）。
- 每步稀释操作均需在涡旋振荡器上混匀 1 min。并且稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 min，用前也需在涡旋振荡器上剧烈混匀 1 min，放置 4 h 以上的内毒素溶液应丢弃。

3) 准备供试品（即待测样品）：

- 所有与待测样品或测试试剂直接接触的材料均应无热原。
- 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。
- 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：

$$\text{MVD} = \text{内毒素限度}^* (\text{EU/mL}) / \text{测定灵敏度}^* (0.125 \text{ EU/mL})$$

^{*}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 0.125 EU/mL）。

- 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，稀释过程应充分漩涡震荡 ≥ 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，可先进行干扰试验，然后再开展鲎试剂的内毒素检测实验。

- 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。

- 除了内毒素，鲎试剂还与某些 β -葡聚糖反应，产生假阳性结果。如遇含有 β -葡聚糖的待测样品，可使用去 G 因子鲎试剂或 G 因子反应抑制剂来排除鲎试剂与 β -葡聚糖的反应。

4) 实验操作：

- 溶解鲎试剂：取 4 支本凝胶法的鲎试剂（安瓿瓶装）^{**}，安瓿开启过程同 2.1).a.内毒素工作标准品。按每瓶上标示量各加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水(Cat#60456ES)，轻轻振摇使鲎试剂完全溶解。

^{*}注意不要引起气泡，溶解后的鲎试剂应在 10 min 内使用（即配即用）。

^{**}如果使用安瓿瓶操作不便，则可将 4 支溶解后的鲎试剂分别分装在无热原玻璃试管(Cat#60457ES)中。

b. 分别向上述 4 支装有溶解了鲎试剂的安瓿瓶或者无热原玻璃试管中加入 0.1 mL 阴性对照^{*}、0.1 mL 阳性对照^{**}、0.1 mL 待测样品、0.1 mL 待测样本阳性对照。

^{*}阴性对照：细菌内毒素检查用水；

^{**}阳性对照：浓度为 2λ（即 0.25 EU/mL）内毒素标准品溶液；

^{***}待测样本阳性对照：含 2λ（即 0.25 EU/mL）内毒素标准品溶液的待测样本。

c. 封闭管口，轻轻摇匀，垂直放入 37±1℃的恒温器(水浴箱或干热恒温仪)中孵育 60±2 min，孵育期间避免振动。孵育结束后，取出观察结果。

5) 结果判断：

a. 将试管从恒温器中轻轻取出，缓慢倒转 180°。若管内形成凝胶，且不变形也不从管壁滑脱，则为阳性，记录为(+); 若管内未形成凝胶或虽生成凝胶但不能保持完整并从管壁滑脱，则为阴性，记录为(-)。

b. 在阴性对照管结果为阴性，阳性对照管和供试品阳性对照管结果均为阳性的前提下，待测样品的实验结果才有效，否则实验结果无效。

3. 鲎试剂灵敏度复核试验

当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响实验结果的改变时，应按《中华人民共和国药典》2020 版中《细菌内毒素检查法》的“鲎试剂灵敏度复核试验”进行试验，具体操作如下：

1) 根据本鲎试剂灵敏度的标示值（λ，即 0.125 EU/mL），将细菌内毒素工作标准品^{*}（凝胶法检测用）(Cat#60451ES)先用内毒素检查用水溶解，再稀释成 2λ、λ、0.5λ 和 0.25λ 四个浓度梯度。

^{*}细菌内毒素工作标准品的安瓿开启过程和超净工作台准备过程、实验注意细节等同 2. 实验方法。

2) 取本凝胶法鲎试剂（安瓿瓶装）18 支，每支加入 0.1 mL 内毒素检查用水溶解^{*}，摇匀，然后将其混匀。

^{*}鲎试剂复溶后不能放到漩涡混合器上混合，因为强烈混合容易使复溶后的鲎试剂产生泡沫，影响凝胶的形成。

3) 将上述 18 支鲎试剂按下表进行分组加不同浓度的内毒素标准品和内毒素检查用水：

组别	每组重复支数	每支加入的试剂 [*]	终溶液
组 1	4	0.1 mL 2λ浓度的细菌内毒素标准溶液	待观察样品
组 2	4	0.1 mL λ浓度的细菌内毒素标准溶液	待观察样品
组 3	4	0.1 mL 0.5λ浓度的细菌内毒素标准溶液	待观察样品
组 4	4	0.1 mL 0.25λ浓度的细菌内毒素标准溶液	待观察样品
组 5	2	0.1 mL 细菌内毒素检查用水	阴性对照

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验样品配制

^{*}每次加样浓度必须是从高到低，加不同浓度的样品需更换新的移液器吸嘴。

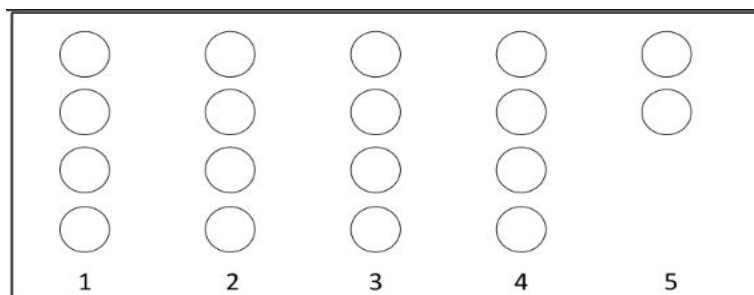


图 1 鲎试剂安瓿排列图^{*}

^{*}图中 1、2、3、4、5 列对应上表中的组 1、组 2、组 3、组 4、组 5。

4) 加样结束后,用封口膜封口,将鲎试剂安瓿中溶液轻轻混匀,应避免产生气泡,连同试管架垂直放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温水浴箱中^{*},试管架保持水平状态,保温 $60 \pm 2 \text{ min}$ 。

^{*}使用温度计监测恒温水浴箱温度是否满足实验要求,每 30 min 进行温度记录。

5) 结果判断及计算:

- 将鲎试剂安瓿从恒温器中轻轻取出,缓慢倒转 180° 。若管内形成凝胶,且不变形也不从管壁滑脱,则为阳性,记录为(+);若管内未形成凝胶或虽生成凝胶但不能保持完整并从管壁滑脱,则为阴性,记录为(-)。
- 在阴性对照管结果为阴性,阳性对照管和供试品阳性对照管结果均为阳性的前提下,待测样品的实验结果才有效,否则实验结果无效。
- 当最大浓度 2λ 的 4 个重复管均为阳性,最低浓度 0.25λ 的 4 个重复管均为阴性,阴性对照的 2 个重复管也为阴性,试验才算有效。
- 按下式计算反应终点浓度的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)。

$$\lambda_c = \text{antilg} (\sum X/n)$$

X: 反应终点浓度的对数值(lg)。反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度。

N: 每个浓度的平行管数(或重复管数)。

当 λ_c 在 $0.5 \sim 2\lambda$ (包括 0.5λ 和 2λ) 时,方可用于细菌内毒素检查,并以标示灵敏度 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

4. 干扰实验

当供试品中可能存在鲎试验的干扰物质时;当鲎试剂、供试品的来源、配方、生产工艺或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时;当对新药或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时;都必须按《中华人民共和国药典》2020 版中《细菌内毒素检查法》的“干扰试验”进行干扰试验。具体操作如下:

1) 按表 1 制备溶液 A、B、C 和 D,使用的供试品溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数(MVD)的溶液,按鲎试剂灵敏度复核试验开展下述操作。

编号	内毒素浓度/被加入内毒素的溶液	内毒素稀释用液	稀释倍数	所含内毒素浓度	平行管数
A [*]	0/供试品	NA	NA	NA	2
B ^{**}	2λ /供试品	供试品溶液	1	2λ	4
			2	λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C ^{***}	2λ /细菌内毒素检查用水	细菌内毒素检查用水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D ^{****}	0/细菌内毒素检查用水	NA	NA	NA	2

表 2 凝胶法鲎试剂干扰试验溶液的配制

^{*}A: 为供试品溶液;

^{**}B: 为干扰试验系列;

^{***}C: 为鲎试剂标示灵敏度对照系列;

^{****}D: 为阴性对照。

2) 当溶液 A 和阴性对照溶液 D 的所有平行管都为阴性,并且系列溶液 C 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时,试验方

为有效。

3) 当系列溶液 B 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时, 认为供试品在该浓度下无干扰作用。若出现其他情况, 则认为供试品在该浓度下存在干扰作用。若供试品溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰, 应将供试品溶液进行不超过 MVD 的进一步稀释, 再重复干扰试验。

可通过对供试品进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法(如过滤、中和、透析或加热处理等)排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性, 要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验。