

Kinetic Turbidimetric LAL Assays

动态浊度法内毒素检测鲎试剂

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Kinetic Turbidimetric LAL Assays 动态浊度法内毒素检测鲎试剂	60401ES06	17 T

产品描述

鲎试剂为鲎科动物东方鲎的血液变形细胞溶解物的冷冻干燥品，鲎试剂中含有 C 因子、B 因子、凝固酶原、凝固蛋白原等。

动态浊度法内毒素检测鲎试剂（Kinetic Turbidimetric LAL Assays）是通过检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度所需要的反应时间，或是检测浊度增加速度来检测内毒素的方法。在适宜的条件下（温度，pH 值及无干扰物质），细菌内毒素激活 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。随着凝胶的形成，反应液的吸光度(OD 值，浊度)增加，OD 值增加的速度与内毒素浓度成正相关。换言之，OD 值上升某一预设限值(启动 OD)所需要的时间(定义为启动时间)与内毒素浓度成负相关，启动时间的对数与内毒素浓度的对数成线性关系，据此，可以定量供试品的内毒素浓度。

产品组分

编号	组分	规格
60401-A	鲎试剂	1.7 mL
60401-B	鲎试剂溶解液	3.0 mL

运输与保存方法

冰袋运输。4°C 避光保存，有效期 2 年。

注意事项

1. 该试剂盒用于体外细菌内毒素的定量检测，严禁试剂以任何途径进入机体。
2. 接触试剂及供试品的所有器皿必须是除热原的。试验过程应防止微生物的污染。
3. 该说明书中的除热原指内毒素浓度小于 0.005 EU/mL。
4. 供试品的 pH 值应在 6.0-8.0 之间，若超出此范围，需用除热原的缓冲液、0.1 M 氢氧化钠或 0.1 M 盐酸调节。
5. 当供试品中可能存在鲎试验的干扰物质时，须进行干扰试验，参见【供试品的干扰试验】。
6. 本产品仅作科研用途！

所需材料和设备

1. 试剂：内毒素工作标准品、鲎试剂、细菌内毒素检查用水。
2. 器材：
除热原试管、除热原吸头、除热原加样槽、除热原 96 孔微板。
旋涡混合器、移液器、多道移液器、试管架。
带温育系统的动态光度测定仪器及配套软件，例如，微板鲎试仪 ELx808 及软件 TALgent 或 Gen5。

操作方法

1. 动态光度测定仪器的设定，以微板萤试仪 ELx808 为例：

预热仪器，设置温育温度为 37°C，设置模板及程序。设定读板波长为 340 nm、630 nm，设定动力学参数：读板 90-120 分钟，每读板间隔 30-150 s。

2. 内毒素标准溶液配制

2.1 标准曲线所采用的内毒素浓度可以为 2 至 10 倍稀释的系列(如 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 EU/mL 或 10, 1, 0.1, 0.01 EU/mL)。

2.2 取内毒素工作标准品 1 支，用砂轮沿安瓿颈部划痕，开启，加入适量（建议在 0.5 mL-1.2 mL 之间）细菌内毒素检查用水，置旋涡混合器上剧烈振摇 5 分钟。

2.3 将上述内毒素溶液进一步用细菌内毒素检查用水稀释成所需浓度，每稀释一步均应在旋涡混合器上剧烈振摇 1 分钟。稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 分钟，用前在旋涡混合器上剧烈振摇 1 分钟，配置时间超过 4 小时的内毒素溶液应丢弃。(参见《内毒素工作标准品使用说明书》)。

3. 阴性对照为细菌内毒素检查用水。

4. 萤试剂的溶解：按标示量加细菌内毒素检查用水于萤试剂中，轻轻振摇使萤试剂完全溶解。注意不要用旋涡混合器剧烈振摇。溶解的萤试剂应在 10 分钟内使用。若采用多道移液器，将溶解的萤试剂转移到除热原加样槽，并轻轻摇匀。

5. 实验操作（微板萤试仪 ELx808）：

5.1 取除热原微板，在各孔中分别加入 100 μ L 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液，或供试品。

5.2 将微板放置于萤试仪中，37°C 温育 10 分钟。

5.3 温育结束，用移液器或多道移液器加入 100 μ L 萤试剂（避免产生气泡!），中速振摇 10 秒混匀，在 340 nm 波长处，每 30 秒（到 60 秒）读一次，读板 120 分钟。

数据处理

设定启动 OD(可以设为 0.02，一般可以在 0.02 到 0.04 之间)，软件自动给出其启动时间(T)。

建立标准曲线： $\lg T = b \lg C + a$ ，其中 T 为启动时间，C 为内毒素的浓度，b 为直线斜率，a 为 Y 轴截距。

当实验数据同时满足如下三个条件时实验才有效：

1. 标准曲线的浓度点 ≥ 3 ，标准曲线的相关系数 $r \leq -0.980$ ，
2. 标准曲线最低点的 T 值小于阴性对照的 T 值，
3. 供试品平行管的平均值在标准曲线的区间内。

【供试品的干扰试验】

1. 当对新药或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时，必须进行干扰试验；

2. 当萤试剂、供试品的来源、配方、生产工艺改变，或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，必须重新进行干扰试验；

3. 当供试品中可能存在萤试验的干扰物质时，须进行干扰试验。

4. 步骤如下：

4.1 选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度（设为 λm ），作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度，如采用标准曲线为 10, 1, 0.1, 0.01 EU/mL 系列时，可以用供试品配制 0.1 EU/mL 内毒素浓度作为实验的供试品阳性对照。

4.2 用供试品溶液配制浓度为 λm 的内毒素溶液（即含 λm 内毒素的供试品阳性对照），测量出该溶液的内毒素浓度，称为 C_s ；

4.3 测量出未添加外源内毒素的供试品溶液内毒素浓度，称为 C_t ；

4.4 计算该试验条件下的回收率 $R = (C_s - C_t) / \lambda m \times 100\%$

4.5 当 R 在 50%~200%之间，则认为在此试验条件下供试品溶液不存在明显干扰作用。

4.6 当 R 在 50%~200%之外，需对供试品进行系列稀释或进行其它处理消除干扰，每一稀释溶液都重复步骤 2-4，直到内毒素的回收率 R 在 50%~200%之间。选择回收率 R 最接近 100%的稀释倍数进行内毒素检测。

(参见《中华人民共和国药典》2020 版中《细菌内毒素检查法》)