



产品说明书

Rhinogen[®] 重组 C 因子内毒素检测试剂盒

Rhinogen[®] Recombinant Factor C Endpoint Fluorescent Assay

测定范围：0.005-5EU/ml，适用于人用和动物用注射药物（如化学药品、放射性药物、抗生素类、生物制品等）及医疗器械（如透析液、植入式器械等）的原辅材料、中间产品、放行产品的内毒素检测

产品货号：RAF-01

目 录

目 录	1
产品信息	3
试剂包装	3
保藏条件	3
产品综述	4
背景	4
概述	5
特性	5
操作方法	6
操作简介	6
需要的耗材及设备（需自备）	6
样品准备	7
荧光酶标仪的灵敏度设置	8
溶解内毒素工作标准品	9
制备内毒素工作标准品溶液	9
加样至测定板	9
配制底物试剂	9
加入底物试剂及荧光检测	10
数据分析	10
操作说明	11
常见问题	12
样品检测没有信号	12
信号强度低	12
标准品孔和阴性对照孔中的高背景信号	12
标准曲线的线性 $R^2 < 0.98$	12
产品文档及支持	13
产品文档	13
联系我们	13

参考文献.....14

产品信息

试剂包装

本试剂盒含有足够进行 96 tests（96 孔板：100μl/孔/test）的试剂：

名称	货号	规格
Rhinogen®重组 C 因子内毒素检测试剂盒	RAF-01	96 tests

试剂盒组分：

• 内毒素工作标准品	冻干粉，效价及重悬体积见标签
• 荧光底物溶液	6ml/瓶×1
• 测定缓冲液	5ml/瓶×1
• rFC 酶溶液	0.6ml/瓶×2
• 无热原水	30ml/瓶×1

保藏条件

采用冰袋运输。收到试剂盒后，请立即置于 2~8℃ 储存。未开启的产品有效期为 12 个月。内毒素工作标准品溶解以后 2~8℃ 储存，有效期为两周。

产品综述

背景

临床输液反应以热原反应危害最大，发生率最高。内毒素（即革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖分子，lipopolysaccharide, LPS）是研究最透彻也是最常见的生物热原，注射即使是 pg 级别的痕量 LPS 也会导致病人严重的热原反应，引起人体发热、休克甚至死亡。内毒素普遍存在且不易灭活，对制药和医疗器械行业是一个挑战。因此，灵敏可靠的内毒素分析技术是非常必须的。

海蜇的阿米巴样细胞（amoebocytes）对 LPS 具有超强敏感性，利用海蜇血液阿米巴样细胞溶解物制成鲎试剂的内毒素检测方法自上世纪 70 年代中期开始应用于医药领域，很快被世界各国广泛采用并将其定为法定的细菌内毒素检查法。经过几十年的发展和改良，鲎试剂内毒素检测法已应用于制药、医疗器械、水质、食品检测以及科研等各大领域。

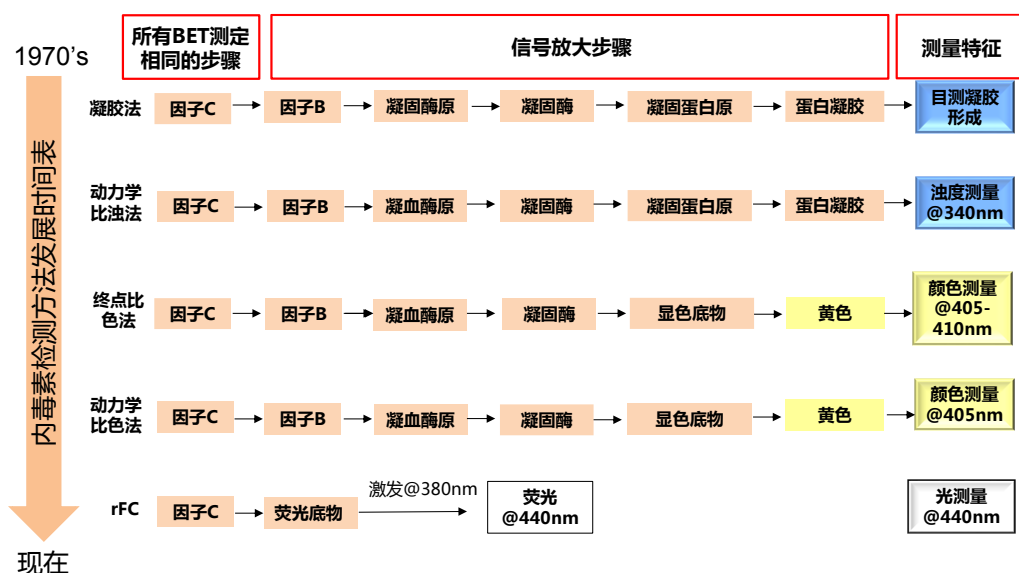


图 1. 鲎试剂检测方法的发展和改良历史

采用成分复杂的海蜇血液细胞裂解物作为反应原料具有无法克服的缺陷。比如，非特异性干扰问题：鲎试剂除了能与内毒素反应外，还会与(1-3)-β-D-葡聚糖反应，造成假阳性结果。再比如，批次稳定性问题：鲎试剂采用海蜇血液作为生产原料，由于季节、地域等差异，使得鲎试剂的批次差异成为常见现象。最后，环境污染等原因造成海洋中鲎数量种群的减少导致原材料越来越难以获得。随着人用和动物用注射药物（如化学药品、放射性药物、抗生素类、生物制品等）及医疗器械（如透析液、植入式器械等）需求迅速增长，开发快捷而可靠的定量检测内毒素的替代方法变得越来越重要。

概述

鲎 C 因子是鲎血细胞中一种对细菌内毒素敏感的丝氨酸蛋白酶原，在细菌内毒素介导的鲎血凝集系统中，鲎 C 因子第一个被内毒素激活而启动整个鲎血细胞中的血凝级联反应。Rhinogen®重组 C 因子是以基因重组的方式表达的东方鲎(*Tachypleus tridentatus*) C 因子重组蛋白(Recombinant Factor C, rFC)，通过内毒素结合并激活的重组 C 因子能够切割底物获得游离的荧光基团，荧光基团的释放与内毒素的浓度呈正比，从而使得内毒素被定量检测。与经典的鲎试剂内毒素检查方法相比，重组 C 因子内毒素检测法具有更高的特异性，更好的专属性、精密度、准确度、线性范围及定量限，是目前鲎试剂内毒素检测方法的改良方法。

特性

Rhinogen®重组 C 因子内毒素检测试剂盒是一种不依赖于动物源性成分，灵敏度高、特异性高、可稳定且持续提供的替代鲎试剂的内毒素测定产品，具有如下特性：

- ✓ 终点荧光测定，与其他定量 LAL 方法相当
- ✓ 液体试剂易于使用
- ✓ 灵敏度范围从 0.005 到 5EU/ml
- ✓ 内毒素特异性，无 G 因子旁路干扰
- ✓ 消除了对动物源试剂的依赖，符合 3R 的替代原则
- ✓ 重组表达生产，产品批间一致性良好
- ✓ 不依赖于动物源性成分，提供更高的供应安全性

本试剂盒可替代传统鲎试剂用于人用和动物用注射药物（如化学药品、放射性药物、抗生素类、生物制品等）及医疗器械（如透析液、植入式器械等）的原辅材料、中间产品、放行产品的内毒素检测。

操作方法

操作简介

该测定在 96 孔板中进行，加样后分别在零小时和在 37℃ ± 1℃ 孵育一小时后使用 380/440nm 的激发/发射波长测量荧光值。用阴性对照的荧光差值 (Δ RFU) 对工作标准品和样品的荧光读数差值 (Δ RFU) 进行校准得到净荧光差值。净荧光差值的对数与内毒素浓度的对数呈比例，且在 0.005 至 5.0 EU/ml 范围内呈线性。根据标准曲线可以计算样品中的内毒素浓度。试剂盒使用操作流程如图 2 所示：

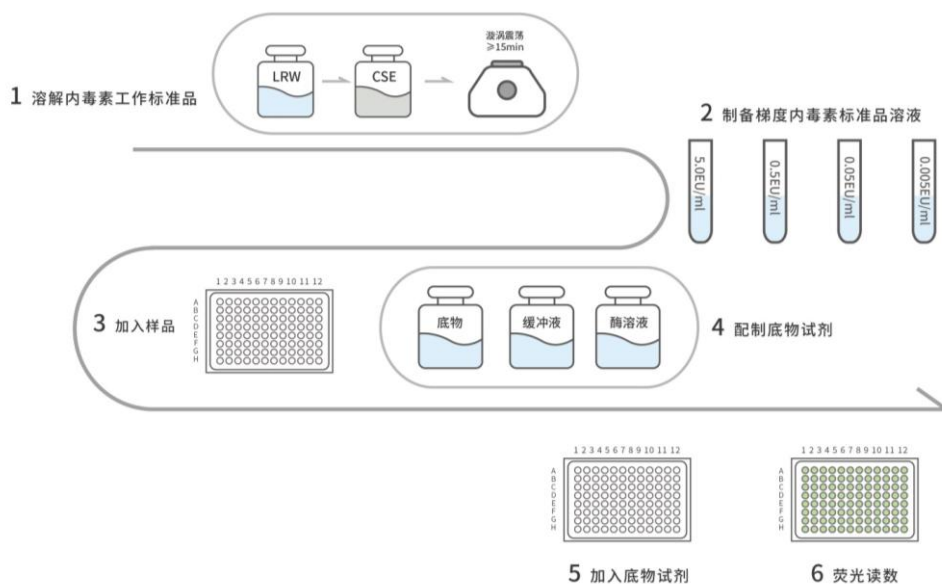


图 2. Rhinogen®重组 C 因子内毒素检测试剂盒的操作原理图

需要的耗材及设备(需自备)

- 1) 一次性无热原安瓿瓶（用于内毒素工作标准品稀释）；
- 2) 单通道、八通道移液器；
- 3) 无热原、低吸附移液器吸头（推荐使用：QSP #Cat.TF112-1000-Q；TF140-200-Q）；
- 4) 一次性无菌无热原 96 孔白板（推荐使用：Nunc#Cat.136101）；
- 5) 无菌无热原试剂槽（可用一次性细胞培养皿代替）；
- 6) 漩涡振荡器；
- 7) 计时器；
- 8) 可进行荧光检测（波长设置为 380/440nm）的酶标仪。

样品准备

- 1、待测样品应小心处理以避免微生物或内毒素污染。所有与样品或测试试剂直接接触的材料均应无热原；样品稀释要在无热原安瓿瓶中用无热原水进行；若不及时检测，建议冷藏或冷冻保存。
- 2、由于 rFC 内毒素测定试剂用于内毒素浓度测定是酶促反应，需要维持样品的 pH 值在 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。

注意：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。

- 3、对内毒素检测无干扰（增强或者抑制）的样品不稀释直接用于检测；对内毒素检测有干扰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≥2min；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，通过适度的稀释能够克服对内毒素检测的干扰；
- 4、使用试剂盒检测样品前需进行适用性研究。通过考察样品内毒素检测的加标回收率来确定样品是否对检测有干扰，若发现样品对检测具有干扰，则需要对该样品进一步进行预处理（调解 pH 值、稀释等），直到克服干扰问题。加标回收率在 50-200% 之间，即认为对检测没有干扰，干扰与否判断例举如下：

样品稀释 倍数	内毒素浓度 (EU/ml)			加标回收 率%	样品干扰 与否	样品内毒素 实际浓度 (EU/ml)
	未加标	加标	差值			
10	0.083	0.106	0.023	4.6	严重干扰	未知
20	0.048	0.284	0.236	47.2	干扰	未知
40	0.027	0.497	0.47	94	无干扰	1.08EU/ml

注意：1) 加标内毒素浓度为 0.5EU/ml；

2) 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 × 100%。

- 5、样品的稀释倍数应小于样品的最大有效稀释倍数，样品最大有效稀释倍数 (MVD) 使用下面的公式计算，其中内毒素限度是未稀释样品中可接受的内毒素浓度最大值，测定灵敏度是测定试剂的最低检测限度（本试剂盒的最低检测限度为 0.005EU/ml），样品的最大稀释倍数计算如下：

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

荧光酶标仪的 灵敏度设置

荧光信号通常记录为相对荧光单位(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。根据检测到的信号强度，可以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。

在 rFC 法进行内毒素检测的试验中， $\log(\Delta \text{RFU})$ 与 $\log(\text{内毒素浓度 EU/ml})$ 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，FLx800™ 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，0.5EU/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 0.5EU/ml 内毒素浓度的最小值。

说明：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。

下面以 FLx800™ 荧光酶标仪为例，进行灵敏度确认：

- 1) 准备一份 0.5EU/ml 的内毒素溶液（见“准备内毒素标准品”）。混合前，使试剂温度自然上升到环境温度。
- 2) 酶标仪检测参数设置如下：

关键参数	设置
激发波长	380nm
发射波长	440nm
光学位置	Top
每个孔的扫描次数	4
扫描前的延迟（毫秒）	150
两次扫描之间的延迟（毫秒）	1
震荡	读数之前震荡 15 秒
验证时酶标板加样孔	C6,7; D6,7; E6,7
待考察灵敏度参数范围	30,35,40,45,50,55

- 3) 向 C6,7; D6,7; E6,7;孔中添加 100μl 的 0.5EU/ml 溶液。
- 4) 加样后的 96 孔板在 37℃ ± 1℃ 的培养箱中，预热 10-20 分钟。
- 5) 配制荧光底物试剂：将提前已平衡至室温的荧光底物溶液、测定缓冲液和 rFC 酶溶液按照 500μl:400μl:100μl 的比例加入至无热原空安瓿瓶中后轻轻混匀，底物试剂按顺序进行移液，现配现用，切勿一次配制过多。
- 6) 向含有内毒素样品的所有孔中添加 100μl 荧光底物试剂。按照屏幕提示开始测试。
- 7) 测试完成后，将不同灵敏度参数范围的数据进行汇总并计算相应的 $\log(\Delta \text{RFU})$ ，选取与 $\log \Delta \text{RFU} = 3.5$ 相近的灵敏度值四舍五入到整数，即为合适的灵敏度值。

注意：1) 灵敏度确认实验应在主要设备维护（比如更换灯泡）后，或对酶标仪性能有疑问时，或验证新批次试剂性能时进行；

2) 如果合适的灵敏度结果不在测试的参数范围内（30、35、40、45、50 和 55），则需根据第一次实验结果，调整待摸索的灵敏度测试范围后重新进行灵敏度确认试验。

溶解内毒素工作标准品

在内毒素工作标准品（以下简称 CSE）冻干粉中按照产品标签加入对应体积的无热原水，得到浓度为 20EU/ml 的溶液，漩涡震荡 $\geq 15\text{min}$ ；

注意：1) 每次移液步骤都要使用新的移液器吸头，以避免污染剩余试剂；
2) 配制后未使用的内毒素工作标准品可于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存两周；
3) 配制后冷藏的内毒素工标准品，取出使用前需漩涡震荡 $\geq 15\text{min}$ ，平衡至室温后方可用于检测。

制备内毒素工作标准品溶液

取用 4 支一次性无热原安瓿瓶，在瓶身标明内毒素工作标准品溶液浓度（分别 0.005、0.05、0.5 及 5EU/ml），用溶解至 20EU/ml 的内毒素工作标准品溶液制备系列内毒素标准品溶液，稀释方法建议如下：

内毒素标准品浓度 (EU/ml)	无热原水加量 (ml)	内毒素工作标准品加量(ml)
5.0	0.75	0.25ml 20EU/ml 溶液
0.5	0.9	0.1ml 5EU/ml 溶液
0.05	0.9	0.1ml 0.5EU/ml 溶液
0.005	0.9	0.1ml 0.05EU/ml 溶液

注意：1) 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；
2) 进行稀释之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（1400rpm） $\geq 2\text{min}$ ，如在准备制备 5EU/ml 内毒素标准品时，先将 20EU/ml 内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 $\geq 2\text{min}$ ；在准备制备 0.05EU/ml 内毒素标准品时，先将 0.5EU/ml 内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 $\geq 2\text{min}$ ；
3) 稀释后的内毒素标准品溶液在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 能稳定 8 小时，8 小时后请弃用。

加样至测定板

1、将 100 μl 阴性对照（无热原水）、内毒素工作标准品溶液、样品（两组）分别加入到 96 孔无菌无热原白板相应孔中，通常需要两复孔或三复孔。在两组样品孔其中一组中加入 10 μl 5EU/ml 的内毒素工作标准品溶液作为加标样品组。
2、加样后的 96 孔板在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中，预热 10-20 分钟。

注意：1) 每次样品检测需同时进行内毒素工作标准溶液检测，绘制新的标准曲线；
2) 建议每个样品均加标。

配制底物试剂

96 孔板预热期间配制底物试剂：

1、底物试剂制备前，提前 30min 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；
2、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。测定孔数及对应配制体积如下表：

测定孔数	荧光底物溶液 μl	测定缓冲液 μl	rFC 酶溶液 μl	配制总体积 μl
12	800	640	160	1600
24	1400	1120	280	2800
36	2000	1600	400	4000
42	2300	1840	460	4600
48	2600	2080	520	5200

54	2900	2320	580	5800
60	3200	2560	640	6400
66	3500	2800	700	7000
72	3800	3040	760	7600
78	4100	3280	820	8200
84	4400	3520	880	8800
90	4700	3760	940	9400
96	5000	4000	1000	10000

注意：1) 按照依次吸取荧光底物溶液、测定缓冲液和 rFC 酶溶液的顺序加入底物试剂至配制容器中，确保 rFC 酶溶液最后加入；

2) 底物试剂请现配现用，切勿一次配制过多。

加入底物试剂 及荧光检测

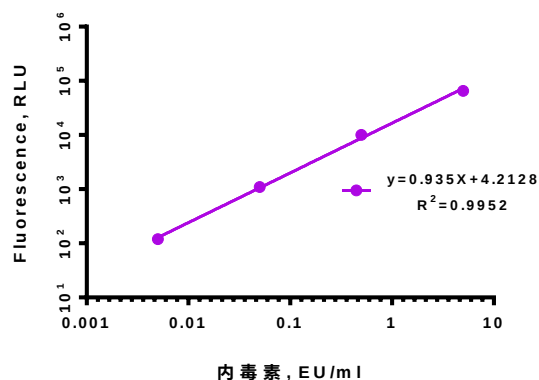
1、设置酶标仪检测参数如下：

关键参数	设置
激发波长	380nm
发射波长	440nm
光学位置	Top
每个孔的扫描次数	4
扫描前的延迟（毫秒）	150
两次扫描之间的延迟（毫秒）	1
震荡	读数之前震荡 15 秒

- 2、取出预热的 96 孔板，使用八通道移液器向所有样品孔中加入底物试剂，100μl/孔；
- 3、底物试剂加入后，立即读取时间点零小时的荧光值；
- 4、将微孔板放在 37℃ ± 1℃ 的培养箱中，孵育一小时后进行时间点一小时的荧光值读数。

数据分析

- 1、将酶标仪读取的荧光值（时间点零小时和时间点一小时）导出到电子表格中；
- 2、所有孔从时间点一小时荧光值中减去时间点零小时荧光值（ΔRFU）；
- 3、从标准品和样品 ΔRFU 数据中减去阴性对照孔的 ΔRFU，得到标准品和样品的净 ΔRFU 值；
- 4、计算内毒素工作标准品平均净 ΔRFU 和浓度（EU/mL）的对数；
- 5、以内毒素工作标准品溶液浓度的对数为横坐标，净 ΔRFU 的对数为纵坐标绘图并进行线性拟合， $\log(\Delta RFU) = A * \log(\text{内毒素浓度 EU/ml}) + B$ ，标准曲线的相关系数 R^2 的值应 ≥ 0.980，示例如下所示：



- 6、 计算样品及加标样品的内毒素浓度，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 × 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；
- 7、 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。

注意：对于标准曲线线性拟合及未知样品内毒素浓度计算，可以人工计算也可以充分利用酶标仪自身软件，通过设置新的检测模板对每次的检测进行自动计算。

操作说明

- Rhinogen® 重组 C 因子内毒素检测试剂盒仅用作样品的体外内毒素检测，不能用于临床诊断和治疗；
- 内毒素检测过程中与测定试剂接触的耗材务必使用明确无菌无热原产品，避免污染测定试剂；
- 使用前，让所有试剂自然平衡至室温（20-25℃）；
- 采用低吸附移液吸头；
- 采用合适的校准移液器，尽可能保证所有小体积液体的精确转移；
- 不同批次的试剂不得混合后使用。

常见问题

样品检测没有信号

样品检测没有信号的可能原因及相应的解决措施如下：

- 移液错误 : 重新检测
- 干扰成分 : 加标预实验或者每次实验的加标回收率不合格，显示干扰，对样品进行稀释或排除干扰
- 不适当的 pH 值 : 检测样品pH值，调节至6-8的中性范围

信号强度低

检测信号低的可能原因及相应的解决措施如下：

- 仪器灵敏度（增益）太低 : 提高敏感度，需要更高的增益
- 酶标仪检测参数设置错误（例如光学） : 检查运行仪器设置参数
- 孵育温度太高/太低 : 检查及校准温度
- 试剂失效（运输或储存）或过期 : 检查储存条件和包装材料；联系技术服务，使用新试剂盒或新试剂

标准品孔和阴性对照孔中的高背景信号

检测背景值高的可能原因及相应的解决措施如下：

- LPS 污染测定组分（底物试剂、测定缓冲液或 rFC 酶溶液） : 用新开封试剂、务必采用无菌无热原吸头

标准曲线的线性 $R^2 < 0.98$

标准曲线线性不好的可能原因及相应的解决措施如下：

- 内毒素工作标准品溶液稀释误差 : 重新精确稀释
- 酶标仪荧光检测灵敏度低导致 5EU/ml 时的荧光值超出仪器检测范围 : 换用荧光检测灵敏度高的酶标仪

产品文档及支持

产品文档

我们的网站 <http://www.rhinobio.com/> 可为您提供最新的服务及支持，包括：

- 常见问题查询
- 购买指南
- 说明书下载
- 质检报告（COA）下载

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
- 技术支持：techserv@rhinobio.com
- 客户服务：sales@rhinobio.com

参考文献

1. Gauvry G. Current Horseshoe crab harvesting practices cannot support global demand for TAL/LAL: The pharmaceutical and medical device industries' role in the sustainability of horseshoe crabs. In: Carmichael RH, Botton ML, Shin PKS and Changing SGC (eds) Global perspectives on horseshoe crab biology, conservation and management. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2015, pp.475–482.
2. MUTA T, MIYATA T, MISUMI Y, T et al. Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains[J]. *Biochem*, 1991, 266(10): 6554-6561.
3. 李世崇, 胡显文, 胥照平. 鲎C因子的性质、结构、功能及应用[J]. *中国生物工程杂志*, 第23 卷第5期.
4. Roopashree S D, Chai C, HO B, et al. Expression of *Carcinoscorpius rotundicauda* factor C cDNA. *Biochem Mol Biol intl*, 35(4): 841-849
5. Roopashree S D, Ho B, Ding J L. Expression of *Carcinoscorpius rotundicauda* Factor C in *Pichia Pastores*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(4): 334-343
6. Roopashree S D, Ho B, Ding J L. Recombinant COS-1 cells express *Carcinoscorpius rotundicauda* factor C cDNA. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(4): 357-361
7. Wang J, Ho B, Ding J L. Functional expression of full length Limulus Factor C in stably transformed Sf9 cells. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(1): 71-76.
8. Bernd Buchberger. Method for recombinant production of horseshoe crab factor C protein in protozoa US20170306315A1.
9. CHEN, Lin, PEPE, Michael. METHODS AND REAGENTS FOR DETECTING ENDOTOXIN. EP 1 409 984 B1.

上海泰坦科技股份有限公司

产品订购，请访问 www.tansoole.com 或致电 400-111-6333

生产商

苏州瑞安生物科技有限公司

寻求技术支持，请访问 www.rhinobio.com 或电邮 techserv@rhinobio.com.