

显色基质鲎试剂盒使用说明书(终点显色法，不含偶氮化试剂)

【用途】显色基质鲎试剂 (Chromogenic End-point Tachypleus Amebocyte Lysate, CE TAL) 用于体外细菌内毒素的定量检测，禁止以任何途径进入机体。

【原理】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。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，激活凝固酶原形成凝固酶，凝固酶分解人工合成的显色基质，使其分解为多肽和黄色的对硝基苯胺（pNA， $\lambda_{\max} = 405\text{nm}$ ）。在一定时间内，pNA的生成量与细菌内毒素浓度成正相关，据此，可以定量供试品的内毒素浓度。

【检测限】按反应时间不同可检测 0.1EU/ml - 1 EU/ml 和 0.01EU/ml - 0.1EU/ml 两个区间。

【试剂盒组成】

鲎试剂，1.7ml/支，2支
细菌内毒素工作品，10EU/支，2支
显色基质，1.7ml/支，4支
显色基质溶解液，2 ml/支，4支
反应终止剂，20ml/瓶，1瓶
细菌内毒素检查用水，50ml/瓶，2瓶

【贮存】阴凉处，2-8℃，避光贮存。

【用法】

1. 材料和设备

1.1 试剂

鲎试剂、细菌内毒素工作品、显色基质、显色基质溶解液、反应终止剂、细菌内毒素检查用水。

1.2 器材

无热原试管、无热原吸头、无热原加样槽、无热原 96孔微板。
旋涡混合仪、移液器、多道移液器、封口膜、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 ELx808IU 及软件 (Gen5 或 TALgent)。

注意：接触试剂及供试品的所有器皿必须是无热原的（我公司提供无热原耗材）。玻璃器皿可经 250℃干烤至少 60 分钟去除热原。

2. 供试品的贮存与预处理

2.1 供试品的 pH 值应在 6 - 8 之间，若超出此范围，需用无热原缓冲液、0.1N 氢氧化钠或 0.1N 盐酸调节。

2.2 若供试品中可能存在鲎实验的干扰物质，处理参见【供试品的干扰试验】。

2.3 若供试品中可能含有 β -葡聚糖（ β -葡聚糖会产生 G 因子旁路反应，干扰内毒素检测），需选用特异性鲎试剂（我公司提供）。

3. 实验操作

3.1 细菌内毒素标准溶液配制

标准曲线所采用的内毒素浓度可以为 0.01, 0.025, 0.05, 0.01 EU/ml 或 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 EU/ml。稀释方法如下（以 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 EU/ml 为例）：取细菌内毒素工作品 1 支，按细菌内毒素工作品使用说明书稀释为 10EU/ml 的内毒素溶液，再稀释为 1.0EU/ml 的内毒素溶液，以 1.0EU/ml 的内毒素溶液为母液按表 1 稀释成 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 EU/ml 的浓度梯度。配制好的内毒素标准溶液应在 4 小时内用完。

表1 内毒素标准溶液配制

内毒素浓度(EU/ml)	1.0	0.5	0.25	0.1	阴性对照
加细菌内毒素检查用水(ml)	0	0.5	0.75	0.9	1
加1EU/ml内毒素溶液(ml)	1	0.5	0.25	0.1	0

3.2 阴性对照为细菌内毒素检查用水。

3.3 微板鲎试仪 ELx808IU 的设定

预热仪器 15 到 30 分钟，设置温育温度为 37℃。

设置模板及程序。

设定读板波长为 405nm。

3.4 鲎试剂与显色基质的溶解

按标示量加细菌内毒素检查用水于鲎试剂中，轻轻振摇使鲎试剂完全溶解，注意不要用旋涡混合仪激烈振摇。溶解的鲎试剂应在 10 分钟内用完。

按标示量加显色基质溶解液于显色基质中，轻轻振摇使显色基质完全溶解。显色基质溶液可在无污染的条件于 4℃贮存 8 小时以内。

若采用多道移液器，将溶解的鲎试剂与显色基质分别转移到无热原加样槽，并轻轻摇匀。

3.5 实验操作

将无热原微板放置于鲎试仪中，37℃温育 5 分钟。

加入 50μl 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液，或供试品。

用移液器或多道移液器加入 50μl 鲎试剂（避免产生气泡），中速振摇 10 秒混匀。

若内毒素浓度在 0.1EU/ml - 1EU/ml 区间，37℃温育 12 分钟。

（若内毒素浓度在 0.01EU/ml - 0.1EU/ml 区间，37℃温育 50 分钟。）

温育结束，用移液器或多道移液器加入 100μl 显色基质溶液，中速振摇 10 秒混匀，37℃温育 6 分钟。

温育结束，用移液器或多道移液器加入 50μl 反应终止剂，中速振摇 10 秒混匀，在 405nm 波长处读取吸光度值。

4. 数据处理

建立标准曲线： $Y = bX + a$ ，其中

Y 为 405nm 处吸光度值，X 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. 标准曲线的相关系数 $r \geq 0.980$ ，
2. 标准曲线最低点的 Y 值大于阴性对照的 Y 值，
3. 供试品平行管的平均值在标准曲线的区间内。

5. 供试品的干扰试验

（详见《中华人民共和国药典》2005 版中《细菌内毒素检查法》的“光度测定法干扰试验”）

当鲎试剂、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，须进行干扰试验，步骤如下：

- 5.1 选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度（设为 λ_m ），作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度，配制含 λ_m 内毒素的供试品阳性对照，测量该溶液的内毒素浓度，称为 Cs；
- 5.2 测量出未添加外源内毒素的供试品溶液内毒素浓度，称为 Ct；
- 5.3 计算该试验条件下的回收率 $R = (Cs - Ct) / \lambda_m \times 100\%$
- 5.4 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干扰作用。
- 5.5 当 R 在 50%~200% 之外，需对供试品进行系列稀释（稀释倍数不得超过最大有效稀释倍数 MVD）或进行其它处理消除干扰，每一稀释溶液都重复步骤 5.1-5.3，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。

【批准文号】[88]卫药准字 SJ-02 号

【生产企业】厦门市鲎试剂实验厂有限公司

地址：厦门市海沧新阳工业区新嘉路 131 号（361022）

销售服务：0592-2085561

技术服务：0592-6518659

传真：0592-2095294

网址：www.houshiji.com