

显色基质鲎试剂盒使用说明书 (终点显色法, 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。同时, 对硝基苯胺 (pNA) 也可用偶氮化试剂染成玫瑰红色 ($\lambda_{\max} = 545\text{nm}$), 避免了供试品本身的颜色对 405nm 处吸收峰的干扰。

【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 (反应时间 T1 和 T2 见出厂检验报告)。

【试剂盒组成】

细菌内毒素工作品, 2 支

鲎试剂, 1.7ml/支, 2 支

显色基质, 1.7ml/支, 2 支

偶氮化试剂 1, 10ml/支, 2 支

偶氮化试剂 2, 10ml/支, 2 支

偶氮化试剂 3, 10ml/支, 2 支

HCl (反应终止剂), 50ml/瓶, 1 瓶

细菌内毒素检查用水, 50ml/瓶, 2 瓶

【贮存】 阴凉处, 最佳 2-8°C, 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、偶氮化试剂 1、偶氮化试剂 2、偶氮化试剂 3、HCl (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。

旋涡混合仪、移液器、多道移液器、封口膜、试管架。

恒温水浴箱 (37±1°C)、分光光度计。

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°C 干烤至少 60 分钟去除热原。

2. 供试品的贮存与预处理

备注: 若供试品为血液类, 请参照我厂配套血液相关处理试剂使用说明书。

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)。

2.4 若供试品为一些抗菌素如头孢类抗菌素和磺胺制剂会对偶氮染色剂产生偶联反应而干扰偶氮化显色, 需要选用不含偶氮化试剂的试剂盒 (我公司提供)。

2.5 若供试品的本底吸光度值大于 0.5, 必须对供试品进行稀释后再检测。

2.6 若供试品颜色较深 (例如溶血), 或在酸性条件下颜色加深 (例如一些组织培养基), 必须设置供试品空白管以扣除供试品自身的颜色本底。

供试品空白管不加入鲎试剂, 以等体积鲎试剂的溶剂 (该处为细菌内毒素检查用水) 代替。其余操作同供试品管。

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, 0.1 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下表稀释成 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	0.5	0.25	0.1
加细菌内毒素检查用水 (ml)	0	0.5	0.75	0.9
加 1EU/ml 内毒素溶液 (ml)	1	0.5	0.25	0.1

3.2 阴性对照为细菌内毒素检查用水。

3.3 鲎试剂、显色基质、偶氮化试剂等的溶解

显色基质特异性鲎试剂盒使用说明书（终点显色法，含偶氮化试剂）

鲎试剂：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，注意不要用旋涡混匀仪激烈振摇。溶解的鲎试剂应在 10 分钟内用完。

显色基质：按标示量加细菌内毒素检查用水于显色基质中，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 °C 贮存 8 小时以内。

偶氮化试剂 1：按标示量加反应终止剂盐酸于偶氮化试剂 1 中，

偶氮化试剂 2：按标示量加细菌内毒素检查用水于偶氮化试剂 2 中，

偶氮化试剂 3：按标示量加细菌内毒素检查用水于偶氮化试剂 3 中，

偶氮化试剂溶液可于 4°C 贮存 1 周。

3.4 实验操作

取无热原试管，加入 100μl 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液，或供试品。

再加入 100μl 鲎试剂溶液，混匀，37°C 温育 T₁ 分钟。

温育结束，加入 100μl 显色基质溶液，混匀，37°C 温育 T₂ 分钟。

温育结束，加入 500μl 偶氮化试剂 1 溶液，混匀，

加入 500μl 偶氮化试剂 2 溶液，混匀

加入 500μl 偶氮化试剂 3 溶液，混匀，静置 5 分钟，于 545nm 波长处读取吸光度值。（见表 2）

表 2 实验操作

	阴性对照	内毒素标准	供试品
加细菌内毒素检查用水(μl)	100		
加内毒素标准溶液(μl)		100	
加供试品(μl)			100
加鲎试剂(μl)	100	100	100
混匀，37°C温育 T ₁ 分钟			
加显色基质溶液(μl)	100	100	100
混匀，37°C温育 T ₂ 分钟			
加偶氮化试剂1溶液(μl)	500	500	500
混匀，加偶氮化试剂2溶液(μl)	500	500	500
混匀，加偶氮化试剂3溶液(μl)	500	500	500
混匀，静置5分钟，于λ545nm读取吸光度值			

（上述 T₁ 及 T₂ 见该批鲎试剂的出厂检验报告）

4. 数据处理

建立标准曲线： $Y = bX + a$ ，其中

Y 为 545nm 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。

【供试品的干扰试验】

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：

- 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，配制含 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 ；
- 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 C_t ；
- 3 计算该试验条件下的回收率 $R = (C_s - C_t) / \lambda m \times 100\%$
- 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 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 1-3，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

电子邮箱：xmhouhiji@126.com

网 址：www.houhiji.com