

热原检测试剂盒 (MAT 法) 说明书

货号：1502100

使用前请认真完整阅读说明书！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 预期用途

单核细胞活化反应测定试验（MAT 法）可检测药品和生物制品中的热原-包含内毒素和非内毒素的热原（即引起人发热的细菌、病毒、真菌）等。**该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。**

■ 检测原理

MAT 原理主要是依据人体发热机理设计：利用单核细胞或单核细胞系模拟人体，以细菌内毒素标准品为基准，检测并比较由标准品与供试品分别作用于单核细胞或单核细胞系所产生的活化反应（即单核细胞的 toll 样受体（TLR）可识别热原，启动免疫系统反应，以释放的促炎症细胞因子（如 IL-6、IL-1、IL-1β、TNF-α）量来评价供试品中热原污染情况。从细菌内毒素标准量效曲线得出的内毒素浓度可等效于热原污染物浓度。

■ 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	培养液	PNS003	25mL × 2 瓶	2-8 ℃
	96 孔微孔板（细胞孵育板）	PNK003	96 孔× 1 块	2-8 ℃
	细菌内毒素检查用水	PNC004	8 mL × 1 管	2-8 ℃
	10×人 IL-6 捕获抗体	PNO004	1 管（粉末）	2-8 ℃
	10×人 IL-6 检测抗体	PNO005	0.6 mL × 1 管	2-8 ℃
	抗体缓冲液	PNF003	6 mL × 1 管	2-8 ℃
	抗体稀释液	PNE007	1.5 mL × 1 管	2-8 ℃
	10×洗涤缓冲液	PNF004	20 mL × 1 管	2-8 ℃
	TMB 溶液	PND007	12 mL × 1 管	2-8 ℃
	终止液	PNI004	12 mL × 1 管	2-8 ℃
	96 孔包被板	PNA022	96 孔× 1 块	2-8 ℃
II	封板膜	PNK004	1 张	2-8 ℃
	培养液添加剂	PNR005	1.5 mL × 1 管	-18 ℃及以下
	细菌内毒素工作标准品	PNB019	150 EU × 1 支	-18 ℃及以下

※注：MAT 细胞-（单核细胞系）属于附赠品（液氮保存，干冰运输）。

■ 规格

96 测试/盒。

■ 有效期

规定储存条件下 6 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（含有波长 450nm 的酶标仪，包含但不限于）

➤ MD SpectraMax M2/i3

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 10μL、100μL、200μL、1000μL 无菌无热原枪头
- 15mL、50mL 无菌无热原离心管
- 5mL、10mL 无菌无热原移液管
- 无菌无热原玻璃试管
- 50mL 容积无菌无热原加样槽

■ 相关设备

- 台式低速离心机（可放置 96 孔板）
- 恒温水浴锅
- 二氧化碳恒温培养箱
- 生物安全柜（或超净工作台）
- 大容量电动移液器
- 八道可调量程移液器
- 漩涡振荡器
- 超纯水仪
- 微孔板恒温振荡器
- 洗板机
- 液氮罐（储存细胞用）

■ 操作过程

操作基本流程示意图



一、细菌内毒素工作标准品溶液制备

1. 配制 20EU/mL 细菌内毒素工作标准品溶液：取出细菌内毒素工作标准品，加入 0.5mL 细菌内毒素检查用水，涡旋震荡 15min，然后使用细菌内毒素检查用水稀释至终浓度为 20EU/mL。

2. 配制细菌内毒素工作标准品：将 MAT 细胞培养液作为稀释液对 20EU/mL 细菌内毒素工作标准品溶液进行梯度稀释，浓度依次为 1EU/mL、0.6EU/mL、0.3 EU/mL、0.1EU/mL、0.05 EU/mL、0.025 EU/mL 和 0.0125 EU/mL，稀释液为阴性对照。（**注意：**工作标准品的每一步稀释旋涡震荡至少 1min。每个浓度设置 4 复孔，加入 96 孔细胞孵育板中。稀释的各浓度梯度内毒素标准溶液应在 4 h 内用完，每次加样前需再次旋涡混匀后添加。）

二、待测供试品溶液制备：

1. 根据《中国药典》确定待测样本所属热原污染物的限值：

供试品的热原污染物限值（contaminant limit concentration, CLC）可用内毒素量表示，按以下公式计算： $CLC = K / M$

CLC：为供试品的热原污染物限值，一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示；

K：为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量，以 EU/(kg·h)表示，注射剂 $K = 5\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ，放射性药品注射剂 $K = 2.5\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ，鞘内用注射剂 $K = 0.2\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ；

M：为人用每千克体重的最大供试品剂量，以 ml/(kg·h)、mg/(kg·h)或 U/(kg·h)表示，中国人均体重按 60kg 计算，人体表面积按 1.62m^2 计算。注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计算。供试品每平方米体表面积剂量乘以 0.027 即可转换为每千克体重剂量 (M)。

2. 根据《中国药典》确定待测样本的最大有效稀释倍数：

供试品的最大有效稀释倍数（maximum validation dilution, MVD)是指在试验中供试品溶液被允许稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行污染物限值的检测。需用以下公式计算： $\text{MVD} = \text{CLC} \times c / \text{LOD}$

CLC：为供试品的热原污染物限值，一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示；

c：供试品溶液浓度，当 CLC 以 EU/mL 表示时则 c 等于 1.0mL/mL，当 CLC 以 EU/mg 或 EU/U 表示时，c 的单位为 mg/mL 或 U/mL。

LOD (Limit of Detection): 最低检测限，即所制备的细菌内毒素标准曲线（S 形四参数拟合曲线）的最低点浓度，该检测限所致单核细胞分泌的内热原量应不小于阈值（阴性对照的平均值加上其 3 倍的标准偏差）；若小于阈值，则将阈值代入上述四参数拟合曲线中，获得的浓度值即为最低检测限。

3. 根据《中国药典》确定供试品溶液的干扰实验设置：

编号	溶液	平行孔数	备注
①	供试品的 A 倍稀释液	4	A 不超过 MVD
②	供试品的 2A 倍稀释液	4	2A 不超过 MVD
③	供试品的 4A 倍稀释液	4	4A 不超过 MVD
④	供试品的 A 倍稀释液+ 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA
⑤	供试品的 2A 倍稀释液+ 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA
⑥	供试品的 4A 倍稀释液+ 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA

4. 供试品溶液的配制:

按以上信息, 将 MAT 细胞培养液作为稀释液, 配制符合稀释倍数要求的供试品稀释溶液, 以及供试品稀释溶液的加标溶液。(注意: 每一步稀释旋涡震荡至少 1min, 相邻浓度间稀释倍数不得大于 10。每次加样前需再次旋涡混匀后添加。)

三、细菌内毒素工作标准品及待测供试品溶液的添加:

细菌内毒素工作标准品(至少 5 个浓度梯度), 以及待测供试品稀释溶液配制完成后, 将各样品(100 μ L/孔)依次添加入 96 孔细胞孵育板中, 设置 4 复孔。每次加样前需再次旋涡混匀后添加。

四、MAT 单核细胞系悬液的制备及种板:

1. 打开 37°C 恒温水浴锅预热细胞培养液, 培养液添加剂室温平衡。
2. 从液氮罐中取出 MAT 细胞, 干冰运输至细胞房。
3. 37°C 水浴快速融化细胞, 待细胞完全融化时, 用 75% 酒精喷洒冻存管消毒并擦干管表面水分, 在生物安全柜中进行后续操作。(注意: 可用消毒镊子夹好细胞, 在水浴中轻轻晃动, 避免水浸过冻存管盖。)
4. 取 5mL 已经预热的细胞培养液加入 50 mL 离心管中, 然后将冻存管中的细胞转入其中, 拧紧管盖, 1000rpm, 室温离心 5min。
5. 丢弃上清, 加入 18mL 细胞培养液和 305 μ L 培养液添加剂, 充分吹打混匀避免细胞结团。

五、MAT 单核细胞系活化反应:

配制好的单核细胞系悬液转入无菌加样槽, 用 8 通道手动排枪, 吹打混匀后依次将细胞悬液按 150 μ L/孔加入到步骤三的 96 孔细胞孵育板中, 37°C, 5% CO₂ 孵育 24h。

六、IL-6 检测:

使用前将所有 ELISA 试剂平衡至室温(25°C \pm 3°C)。

1. 配制 1 \times 洗涤缓冲液: 用去离子水稀释 10 \times 洗涤缓冲液, 配制 200mL 的 1 \times 洗涤缓冲液(20mL 的 10 \times 洗涤缓冲液 + 180mL 的去离子水), 轻轻颠倒混匀。
2. 配制 10 \times 人 IL-6 捕获抗体: 取出冻干粉状的 10 \times 人 IL-6 捕获抗体, 加入 660 μ L 抗体稀释液, 室温静置 10 分钟, 然后轻轻颠倒混匀, 切勿涡旋振荡。
3. 配制抗体混合液: 600 μ L 的 10 \times 人 IL-6 捕获抗体 + 600 μ L 的 10 \times 人 IL-6 检测抗体 + 4.8 mL 抗体缓冲液。
4. 细胞培养物上清收集: 96 孔细胞孵育板孵育 24h 后取出, 2000g, 室温离心

10min，以清除碎片。（**注意：**离心时配平，切勿让细胞板倾斜泄漏液体。）

5. 取出 96 孔包被板条，用 8 通道手动排枪吸取细胞培养物上清加入板条中，100μL/孔。

6. 向板条中加入已配制好的抗体混合液，50μL/孔。

7. 用封板膜密封板条，置于微孔板恒温振荡器中，800rpm，37℃孵育 80min。

8. 1× 洗涤缓冲液洗板 3 次，350μL/孔。每次加液后静置 1min 再弃去上清。（可洗板机操作）

9. 加入 TMB 溶液，100μL/孔，800rpm，37℃避光孵育 5-20min。（**注意：**加入终止液后，颜色由蓝色变为黄色，信号强度增强约 3 倍。为避免信号饱和，在标准品的高浓度 OD600 达到 1.0 之前进行下一步操作。）

10. 加入终止液，100μL/孔。

11. 震荡混匀 1min，使用酶标仪 450nm 波长处读取 OD 值。

■ 数据处理

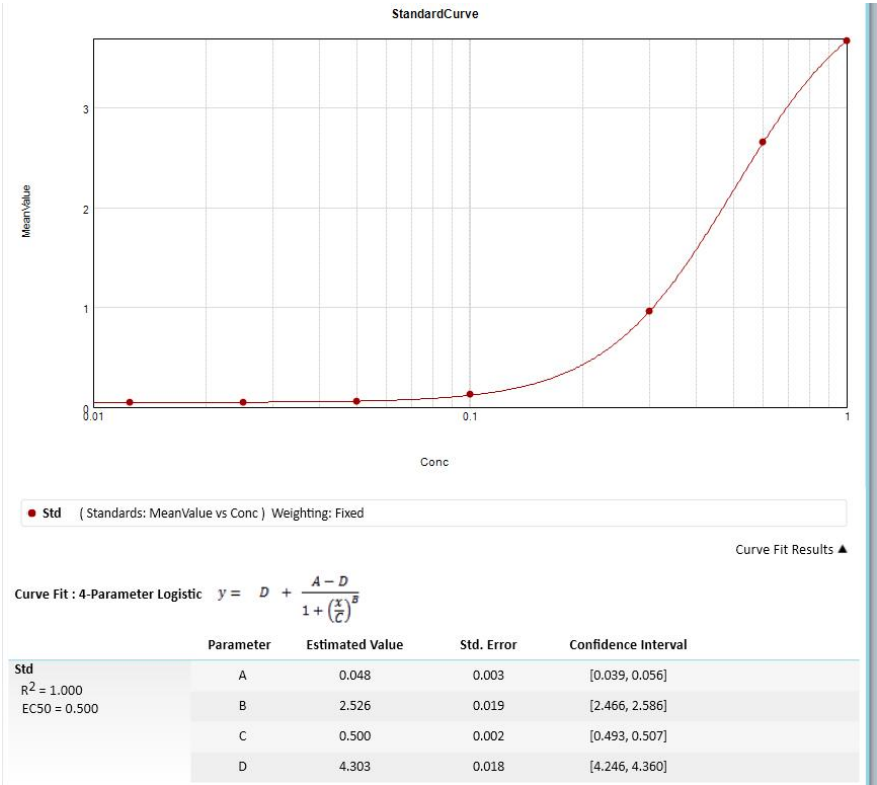
根据不同浓度梯度的细菌内毒素工作标准品测定的吸光值 OD₄₅₀，建立四参数拟合标准曲线： $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$ ，其中：Y 为 OD，X 为内毒素的浓度，A 为曲线上渐近线估值，D 为曲线下渐近线估值，B 为曲线的斜率，C 为最大结合一半时对应的剂量。（标曲要求：标准曲线的浓度点≥4，线性相关系数 $R^2 \geq 0.980$ ）

将测定的各供试品稀释溶液吸光值 OD₄₅₀ 代入标准曲线，计算对应的内毒素浓度，并计算样本回收率。

供试品稀释溶液中内毒素的回收率 R：

$$R = (C_{\text{加标后}} - C_{\text{加标前}}) / C_{\text{加入的内毒素标准品}} \times 100\%$$

根据《中国药典》要求，在建立一个品种的 MAT 法时，须先进行细菌内毒素加样回收干扰实验，当内毒素回收率在 50%~200%之间，则认为此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。当内毒素回收率在 50%~200%之外，需对供试品再次稀释或进行其它处理消除干扰，直到内毒素的回收率在 50%~200%之间。



细菌内毒素工作标准品标准曲线图（示例）

■ 产品性能指标（用户可根据实际样品法规要求制定相应指标）

- 1. 定量限：0.025 EU/mL；
- 2. 检测限（LOD）：根据每次检测标准曲线及药典要求计算；
- 3. 线性范围：0.0125~1.0 EU/mL，相关系数 R²≥0.980；
- 4. 精密度：重复性 CV≤25%；

■ 注意事项

- 1. 该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断疾病，严禁试剂以任何途径进入人体；
- 2. 实验操作过程应严格规范，穿戴好实验防护服、口罩、手套及头套，并保持实验环境的干净整洁；
- 3. 本试剂盒实验操作涉及所有实验材料及耗材均需保持无菌无热原；
- 4. 细菌内毒素工作标准品及供试品的稀释，必须使用无内毒素玻璃试管完成，切勿使用塑料管和 EP 管等，按实验要求严格保持每一步的稀释振荡时间足够；
- 5. 细胞培养液需要提前 37℃ 预热，培养液添加剂需提前室温解冻；
- 6. IL-6 检测前，需提前将试剂盒各组份平衡至室温，试剂配制需现用现配。
- 7. 本法不适用于本身能刺激或抑制单核细胞系促炎症因子的释放以及对细胞增殖有明显影响的供试品。

■ 参考文献：

1. 《中国药典》（通则 9301），单核细胞活化反应测定
2. European Pharmacopoeia, chapter Monocyte activation test (2.6.30)

生效日期：2024 年 04 月 30 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189