

鲨试剂（动态显色法） 说明书

货号：1501105

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

细菌内毒素能特异性地激活反应主剂中的 C 因子，活化的 C 因子激活 B 因子，活化的 B 因子进而激活凝固酶原，凝固酶水解反应中的显色底物，产生游离的 pNA（对硝基苯胺）从而引起吸光度变化，根据动态检测溶液吸光度变化率对细菌内毒素浓度进行定量。

本产品用于定量测定人用和动物用注射药物、生物制品及医疗器械等样本中的细菌内毒素的含量。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	数量	规格
R1 反应主剂	4 支	2.6mL
R2 工作标准品	6 支	按标签所示
R3 检查用水	3 支	8mL
R4 主剂复溶液	4 支	3mL
R5 微孔板	1 块	96 孔

■ 包装规格

96T/盒

■ 检测限

0.005-5 EU/mL

■ 储存条件及有效期

2-8°C 储存，规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用仪器

微孔板检测仪或带温浴、震板功能同时可进行动力学读数的酶标仪，所需波长 405nm

■ 检验方法

1. 内毒素限值的确定

药品、生物制品的细菌内毒素限制（L）一般按以下公式确定：

$$L=K/M$$

L 为供试品的细菌内毒素限制，一般以 EU / ml、EU / mg 或 EU / U（活性单位）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 $\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 表示, 注射剂 $=5 \text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, 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 为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量, 以 $\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 、 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 或 $\text{U}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 表示, 人体重按 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. 供试品溶液的制备

当供试品需要控制的内毒素限值 (L) 大于鲎试剂的灵敏度值时, 需要用检查用水对供试品进行稀释, 计算公式如下:

$$\text{MVD} = cL/\lambda$$

MVD: 供试品的最大有效稀释倍数;

L: 供试品需控制的内毒素限制 (EU/mL)

c: 为供试品溶液的浓度, 当 L 以 EU/mg 或 EU/mL 表示时, 则 c 等于 $1.0 \text{mL}/\text{mL}$, L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时, c 的单位需为 mg/mL 或 U/mL 。如供试品为注射用无菌粉末或原料药, 则 MVD 取 1, 可计算供试品的最小有效浓度:

$$c = \lambda/L$$

λ : 为细菌内毒素检测试剂盒标示灵敏度 (EU/mL), 本产品灵敏度为 $0.005 \text{EU}/\text{mL}$ 。

举例:

某供试品需要控制的内毒素限值为 $1 \text{EU}/\text{mL}$, 使用灵敏度 $\lambda = 0.005 \text{EU}/\text{mL}$ 的鲎试剂作为细菌内毒素检查, 则 $\text{MVD} = 200$ 倍, 即供试品最大可稀释 200 倍后进行检查。

3. 细菌内毒素标准品溶液制备

1) 溶解: 取 R2 工作标准品 1 支, 按标签所示使用 R3 检查用水复溶, 置涡旋混匀器上混匀至少 10min, 得 $5 \text{EU}/\text{mL}$ 细菌内毒素标准品溶液。

2) 稀释: 内毒素梯度浓度 5 、 0.5 、 0.05 、 $0.005 \text{EU}/\text{mL}$, 每稀释一步均应在涡旋混匀器上剧烈震荡 2 分钟。内毒素标准溶液配制可参考下表:

内毒素浓度 (EU/mL)	检查用水体 (mL)	加入内毒素浓度 (EU/mL)	加入内毒素体积 (mL)
0.5	0.9	5.0	0.1
0.05	0.9	5	0.1
0.005	0.9	0.5	0.1

若稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 分钟,用前须在涡旋混匀器上剧烈震荡 2 分钟,放置 4 小时以上的内毒素溶液应丢弃。

4. 阴性对照：为检查用水。

5. 主剂复溶：取主剂复溶液 2.6mL 溶解反应主剂，振荡混匀，静置待用。

6. 实验操作

1) 在微孔板中分别加入 100 μ L 标准品、阴性对照以及供试品溶液，至少 2 个复孔。

2) 向加有标准品、阴性对照以及供试品溶液的微孔中加入 100 μ L 反应主剂溶液；

3) 检测前，微孔板震动 5~10s。设定 Onset OD=0.05~0.2 (起始点与终点 OD 的差值)，在 37 $^{\circ}$ C 下，波长 405nm 下进行检测 90min，反应结束后得启动时间 (T)。

7. 结果计算

1) 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。

2) 根据标准曲线计算样品内毒素浓度。

注意：为保证检测结果准确性，检测时请在 5min 内将反应主剂加入到待检测微孔板中。

■ 供试品的干扰实验

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；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，必须重新进行干扰试验；当供试品中可能存在鲎试剂的干扰物质时，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。

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 ；

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

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干扰作用。

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》细菌内毒素检查法)

■产品性能指标

重复性: 试剂盒重复检测结果的 CV (%) 值应不大于 15%。

线性: 在浓度 0.005EU/mL~5EU/mL 范围内, 其线性相关系数的绝对值 ≥ 0.980 ;

空白: 标准曲线最低点的 T 值小于阴性对照的 T 值。

■注意事项

1. 本品仅用于体外细菌内毒素的定量检测, 禁止试剂以任何途径进入人体。
2. 试剂盒使用前仔细检查试剂盒是否破损和阅读产品说明书, 发现错误和缺损禁止使用, 以免影响测定结果。
3. 试剂盒中的成份可能会导致皮肤和眼睛疼痛, 也可刺激黏膜和上呼吸道, 应避免与皮肤接触, 避免吸入和食入。
4. 实验操作应在无菌无热原的环境下, 避免微生物病原体污染, 该说明书中除热原指内毒素浓度小于 0.005EU/mL。
5. 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、0.1M 氢氧化钠或 0.1M 盐酸调节。
6. 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】。

■参考文献

[1]Levin J.The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood[J]. Bull Johns Hopkins Hosp, 1964, 115.

[2]Levin J,Bang FB.Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin[J].Thromb Diath Haemorrh. 1968 Mar 31;19(1):186-197.

生效日期: 2024 年 03 月 22 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