



# EndoSynX™ 重组级联试剂

## (显色法)

### 说明书

版本：A/0

英文名称：EndoSynX™ Recombinant Cascade Reagent (rCR)  
(Kinetic-Chromogenic Assay)

货号：1501113 规格：96 tests/Kit

**所述产品仅供研究使用，不得用于诊断及治疗目的。**



在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

## 第一章 产品信息

### 1.1 产品描述

重组级联试剂（Recombinant Cascade Reagents, rCR）是一种通过重组表达合成的级联酶反应体系，与天然鲎试剂识别内毒素具有相同的反应机制。该体系中包含重组 C 因子、重组 B 因子和重组凝固酶原。反应体系中不包含天然鲎中所存在的 G 因子，从而有效消除了 $\beta$ -D-葡聚糖和鲎试剂反应物（Limulus Amebocyte Lysate-Reactive Material）对内毒素检查的干扰。当供试品中存在内毒素时，重组 C 因子识别内毒素后活化，会级联激活下游重组 B 因子和重组凝固酶原。凝固酶原转化为凝固酶后，可以切割带有显色基团的多肽底物，释放出可被酶标仪检测的呈色基团，从而实现内毒素含量的定量检测。

本产品适用于定量检测人用和动物用注射药物、生物制品及医疗器械等样品中的内毒素含量。

### 1.2 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Recombinant Cascade Reagent A (重组级联试剂 A)	PNR018	4 vials	2-8 °C
Recombinant Cascade Reagent B (重组级联试剂 B)	PNR019	4 vials	
Recombinant Cascade Buffer (重组级联缓冲液)	PNR016	2 × 2.5 mL	
96-well Microplate (检测孔板 (96 孔))	/	1 Plate	
Water for BET (细菌内毒素检查用水)	NND072	3 × 8 mL	

### 1.3 检测范围

0.005-5.0 EU/mL

### 1.4 有效期

规定储存条件下 12 个月，具体详见试剂盒标签。

## 1.5 实验所需设备/材料

表 2. 实验所需设备/材料

设备	动力学光度测定仪：带有温度控制、振荡功能，可进行动力学读数，检测波长为 405 nm。
	多道移液器、单道移液器
	涡旋振荡器
耗材	无菌无热原玻璃试管或西林瓶（货号：1904100、1904101、1904109）
	无菌无热原枪头（货号：1904102-200、1904102-1000）
	50 mL 无菌无热原加样槽
试剂	细菌内毒素工作标准品（推荐中国食品药品检定研究院，货号：150601）

## 1.6 内毒素限值 (L) 确定

药品、生物制品的细菌内毒素限值 (L) 一般按以下公式确定：

$$L=K / M$$

1. L 为供试品的细菌内毒素限值，一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U（活性单位）表示。
2. K 为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。其中：
  - ① 注射剂 K=5 EU/(kg·h)；
  - ② 放射性药品注射剂 K=2.5 EU/(kg·h)；
  - ③ 鞘内用注射剂 K=0.2 EU/(kg·h)。
3. M 为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量，以 mL/(kg·h)、mg/(kg·h)或 U/(kg·h)表示。其中：
  - ① 人均体重按 60 kg 计算，人体表面积按 1.62 m<sup>2</sup> 计算；
  - ② 注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计算；
  - ③ 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)。

## 1.7 最大有效稀释倍数 (MVD) 确定

1. 最大有效稀释倍数是指在试验中供试品溶液被允许达到稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测。
2. 用以下公式来计算 MVD：

$$MVD=cL / \lambda$$

- ① L 为供试品需控制的内毒素限值；
- ② c 为供试品溶液的浓度：
- 当 L 以 EU/mL 表示时，则 c 等于 1.0 mL/mL；
  - 当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时，c 的单位需为 mg/mL 或 U/mL；
- ③  $\lambda$  是指在光度测定法中所使用的标准曲线上最低点的内毒素浓度或灵敏度，本试剂盒  $\lambda$  为 0.005 EU/mL。

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

## 第二章 试剂盒使用

### 2.1 检测流程

1. 动力学光度测定仪需提前设置以下程序并进行预热。

表 2. 仪器参数设置（以 MD SpectraMax M2 为例）

指标	参数
温度控制	37 °C
读取类型	ABS, 动力学检测
振荡时间（检测前）	中速, 5-10 秒
检测波长	405 nm
检测时长	60 分钟
读板间隔	30 秒-60 秒
Onset OD (起始点与终点 OD 的差值)	0.02-0.1

**备注:** Onset OD 值设定与客户仪器及样品存在联系, 建议开始设置 0.1 后看检测体系是否符合要求, 如符合则选择 0.1, 如不符合可根据体系进行调整, 直到检测体系满足要求为止。

#### 2. 内毒素标准品溶液制备

- 1) 溶解: 取细菌内毒素工作标准品 1 支, 按照供应商提供的细菌内毒素工作标准品说明书复溶, 置涡旋振荡器上混匀至少 15 分钟, 得标签所示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 EU/mL, 使用无菌无热原玻璃试管或西林瓶进行稀释, 每稀释一步均应在涡旋振荡器上剧烈振荡 2 分钟。以 90 EU/mL 细菌内毒素工作标准品为例, 溶液配制可参考下表:

表 3. 内毒素标准品溶液配制

内毒素浓度 (EU/mL)	检查用水体积 (mL)	加入内毒素浓度 (EU/mL)	加入内毒素体积 (mL)
10	0.8	90	0.1
5	0.5	10	0.5
0.5	0.9	5.0	0.1
0.05	0.9	0.5	0.1
0.005	0.9	0.05	0.1

**备注:** 若稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 分钟, 使用前须在涡旋振荡器上剧烈振荡 2 分钟, 放置超过 4 小时的标准品溶液应丢弃。

### 3. 供试品准备

- 1) 按照检测需求配制供试品, 供试品包括未加标样品和与未加标样品同稀释倍数的加标样品, 加标样品中内毒素浓度参考 2.3 供试品干扰试验章节。

### 4. 加样

- 1) 取 96-well Microplate (检测孔板), 在相应孔中分别加入 100  $\mu$ L 的内毒素标准品溶液、内毒素检查用水 (阴性对照), 和供试品 (包含未加标样品和加标样品), 至少 2 个重复。

### 5. 反应液制备

- 1) 重组级联试剂 A 复溶液: 取用 0.75 mL Water for BET (细菌内毒素检查用水), 复溶 1 支 Recombinant Cascade Reagent A (重组级联试剂 A) 冻干粉, 轻轻摇晃瓶身, 使得粉末溶解变澄清。
- 2) 重组级联试剂 B 复溶液: 取用 0.75 mL Water for BET (细菌内毒素检查用水), 复溶 1 支 Recombinant Cascade Reagent B (重组级联试剂 B) 冻干粉, 轻轻摇晃瓶身, 使得粉末溶解变澄清。
- 3) 根据反应孔数, 配制相应体积的反应液, 可参考下表示例 (注意包含移液损耗):

表 4. 反应液配制

反应孔数	1 个 (μL)	24 个 (μL)	48 个 (μL)
Recombinant Cascade Buffer (重组级联缓冲液)	50	1300	2500
重组级联试剂 A 复溶液	25	650	1250
重组级联试剂 B 复溶液	25	650	1250
总体积 (μL)	100	2600	5000

**备注:** 各组分配制前需要放置室温, 待温度达到室温后进行配制。反应液配制加样顺序为: 重组级联缓冲液-重组级联试剂 A 复溶液-重组级联试剂 B 复溶液。反应液配制完毕后需上下颠倒混匀, 避免剧烈振荡。

## 6. 加反应液

- 1) 每孔加入 100 μL 反应液后立即上机检测 (避免产生气泡)。

**备注:** 为保证检测结果准确性, 请在 5 分钟内将反应液加入到检测孔板中。

## 7. 上机检测

- 1) 按照预先设定的检测程序进行检测。

## 2.2 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。

**备注:** 当实验数据同时满足如下三个条件时实验才有效:

- 1) 标准曲线的浓度点  $\geq 3$ , 标准曲线的相关系数 (r) 的绝对值  $\geq 0.980$ ;
- 2) 标准曲线最低点的 T 值小于阴性对照的 T 值;
- 3) 供试品复孔的平均值在标准曲线的区间内。

## 2.3 供试品干扰试验

1. 选择标准曲线中点或靠近中点的一个内毒素浓度 (设为  $\lambda m$ ), 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  $\lambda m$  的内毒素溶液 (即含  $\lambda m$  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 值介于 50%-200% 时, 表明在此试验条件下供试品溶液无明显干扰作用。
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。

---

**备注:**

- 1) 对于此前未设立内毒素检查项的样品, 在建立内毒素检查法时, 必须进行干扰试验;
  - 2) 当重组级联试剂、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;
  - 3) 当供试品中可能存在本试验的干扰物质时, 须进行干扰试验。
- 

## 2.4 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. 试剂盒中的成分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。
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 (内毒素浓度小于 0.005 EU/mL)、0.1 M 氢氧化钠或 0.1 M 盐酸调节。
6. 当供试品中可能存在本实验的干扰物质时, 须进行干扰试验, 参见供试品干扰试验测试步骤。

### 第三章 参考文献

1. 《中国药典》：9251 细菌内毒素检查法应用指导原则
2. 《中国药典》：1143 细菌内毒素检查法
3. 《中国药典》：9301 注射剂安全性检查法应用指导原则
4. Ph.Eur. <2.6.14> Bacterial Endotoxin
5. USP <85> Bacterial Endotoxins Test
6. USP <86> Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Reagents

生效日期：2026 年 03 月 18 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话：400-878-2189