

Version: 02

Update: 07/07/2023

## ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit Cat.No.: L00350/L00350C

### I. 产品描述

GenScript ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit 是一种体外细菌内毒素检测系统，适用于人和动物注射用药物、生物制品和医疗器械。该系统不适用于检测许可试剂、临床样本中的内毒素或诊断人类疾病。鲎试剂（Lyophilized Amebocyte Lysate, LAL）由来自鲎（*Tachypleus tridentatus*）的变形细胞裂解物制成。本品使用可按照《中国药典》2020 版-细菌内毒素检查法进行相关实验。

#### 警告

不适用于含有  $\beta$ -葡聚糖的样品检测， $\beta$  葡聚糖会产生 G 因子旁路反应干扰内毒素检测。不适用于人类或动物的内毒素血症或临床诊断、患者管理、细胞细菌培养基、血清、血液或血液制品。

#### 背景

对于生物制药公司而言，内毒素检测是一项关键的质量控制测试，可确保药品生产不受内毒素污染。

#### 简介

该试剂盒设计为一种定量分析方法，可简单灵敏地检测样品中是否存在脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）。它使用比色法，其中内毒素催化 LAL 中酶原的活化，后者可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,  $\lambda_{max} = 405nm$ ）。用偶氮化试剂将对硝基苯胺（pNA）染成玫瑰红色（ $\lambda_{max} = 545nm$ ），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。可测量的内毒素浓度范围为 0.01 至 1 EU/mL。

#### 特征

- 良好的线性和重现性
- 高灵敏度和广泛的应用范围
- 即用型试剂和材料

#### 产品图片



1

## 试剂盒组分

产品包装				标签	体积
L00350 (32 rxns)		L00350C (16 rxns)			
L00350	L00350Y	L00350C	L00350CY		
3 bottles	-	2 bottles	-	LAL Reagent Water	50 mL
-	2 vials	-	1 vial	Limulus Amebocyte Lysate - (LAL)	
-	2 vials	-	1 vial	<i>E. coli</i> Endotoxin Standard	-
-	2 vials	-	1 vial	Chromogenic Substrate	-
2 vials	-	1 vial	-	Color-stabilizer #1	-
2 vials	-	1 vial	-	Color-stabilizer #2	-
2 vials	-	1 vial	-	Color-stabilizer #3	-
10 x 5 vials	-	5 x 5 vials	-	Endotoxin-free Vials	-
1 box (96 tips)	-	1 box (96 tips)	-	Endotoxin-free Tips	200 µL
2 bags (12 tips)	-	2 bags (12 tips)	-	Endotoxin-free Tips	1000 µL
1	-	1	-	Incubation Rack	-

## II. 其他需准备材料及设备

1. 浓盐酸, 36%-38 %
2. 氢氧化钠, 0.1 M, 溶解在 LAL 试剂水中。该试剂用于必要时调节样品 pH 值
3. 盐酸, 0.1 M, 在 LAL 试剂水中稀释。该试剂用于必要时调节样品 pH 值
4. 水浴, 设置在  $37 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$
5. 带有 545 nm 滤光片的光谱仪或 545 nm 的酶标仪
6. 涡流混合器
7. 计时器

### 储存条件

L00350Y、L00350CY 储存在  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。L00350、L00350C 存放于阴凉处。COA 文件可以在金斯瑞官方网站 (<https://www.genscript.com.cn/product/documents?ent-SDS>) 通过货号 (Cat. No.)、批次号 (Lot. No.) 查询获得。

### III. 实验步骤

#### 1. 样本制备

用于样本采集和制备或测试试剂的所有材料或稀释剂必须不含内毒素。待测样品必须以阻止所有细菌活动的方式储存。例如，建议样品使用前 24 小时内可以储存在 2-8 °C，但长期使用需冷冻保存。如果样品的预估水平比较高，建议在检测前进行适当的涡旋，防止内毒素聚集出现假阴性。

#### 干扰试验

无内毒素检查项的品种新建立内毒素检查法时都应按照《中国药典》2020 版-细菌内毒素检查法进行干扰实验的测试。若有任何可能影响实验结果的变化发生时，需重新进行干扰试验。

#### pH

使用 LAL 试剂水溶解或稀释供试品。由于鲎试剂-内毒素反应依赖于 pH，样品的 pH 值应在 pH 6-8 (18-26°C) 以确保良好的线性。因此，如有必要，我们建议使用 0.1 M 氢氧化钠或 0.1 M 盐酸调节供试品 pH 值。

#### MVD (最大有效稀释倍数)

通过内毒素限度 (单位为 EU/mL) 除以  $\lambda$  计算得出的稀释系数。对于终点显色法试剂盒来说， $\lambda$  是所选择曲线范围的下限值，比如当选用 0.01-0.1 EU/mL 的曲线进行实验时，灵敏度  $\lambda=0.01$  EU/mL。当样品中估计的内毒素水平超出检测范围时，样品需要在检测前稀释。稀释系数由 MVD\* 决定。为获得最佳结果，请勿超过样品的 MVD。

#### 2. 试剂制备

**注意：**建议往试管中加入鲎试剂 (LAL) 前再溶解 LAL 冻干粉，放置 4 小时以上的内毒素标准品溶液应丢弃，其他试剂均可提前配制。

##### 2.1 内毒素标准品 (*E. coli* Endotoxin Standard)

每批次冻干内毒素标准品的效价可能不同，具体效价请参考试剂瓶身上的标签信息。

**2.1.1 溶解：**加入适量 LAL 试剂水，复溶后置旋涡混匀器上混匀 15 分钟。

若内毒素标准品效价  $P > 50$  EU/瓶，可加入 (P/50) mL LAL 试剂水，制备浓度为 50 EU/mL 的内毒素标准品溶液，再根据实验需要逐步稀释。

若内毒素标准品效价  $20 < P \leq 50$  EU/瓶，则可加入 (P/20) mL LAL 试剂水，制备浓度为 20 EU/mL 的内毒素标准品溶液，再根据实验需要逐步稀释。

若内毒素标准品效价  $P \leq 20$  EU/瓶，则可加入 (P/10) mL LAL 试剂水，制备浓度为 10 EU/mL 的内毒素标准品溶液，再根据实验需要逐步稀释。

**2.1.2 稀释：**上述内毒素标准品溶液可用 LAL 试剂水进一步稀释成多个不同的浓度梯度，稀释时应在旋涡混合器上混匀至少 30 秒。每一步稀释的稀释倍数不得超过 10 倍。

**注意事项：**如稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 分钟，用前应在旋涡混合器上剧烈混匀 1 分钟。放置 4 小时以上的内毒素标准品溶液应丢弃，不建议冷冻内毒素标准品溶液。

##### 2.2 鲎试剂 (LAL)

加入 1.7 mL LAL 试剂水，复溶冻干粉。轻轻翻转溶解，避免起泡，然后放置 30 秒，此时液

体会逐渐变澄清。**注意该试剂必须在 10 分钟内用完 (现用现配)**, 请勿使用吹打、涡旋、加热和超声波等剧烈方法溶解 LAL, 这可能会影响其稳定性和灵敏度。

### 2.3 显色底物 (Chromogenic Substrate)

加入 1.7 mL 的 LAL 试剂水复溶底物。复溶后底物溶液在 2-8°C 下可稳定保存 1 个月。避免将显色底物溶液长时间直接暴露在光线下。

### 2.4 偶氮试剂#1 (Color-stabilizer #1)

首先, 将 2 mL 浓盐酸加入 50 mL LAL 试剂水中并充分混合 1 分钟, 制成终浓度为 0.46 M HCl 溶液。如果浓度低于预期, 可能导致异常结果。

**注意: 此步骤应在通风橱中操作, 因为浓盐酸具有强挥发性。**

然后, 用 10 mL 0.46 M HCl 复溶偶氮试剂#1, 此溶液又称终止液。配制好的终止液在 2-8°C 下可稳定保存 1 周。

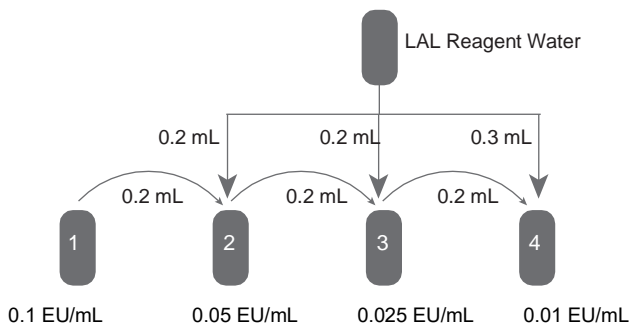
### 2.5 偶氮试剂 #2 和 #3 (Color-stabilizer #2,#3)

分别用 10 mL LAL 试剂水复溶偶氮试剂 #2、#3。复溶后的溶液在 2-8°C 下可稳定保存 1 周。

### 准备不同浓度的内毒素标准品稀释液

准备 1 EU/mL 内毒素溶液以制备标准浓度系列溶液。在每次检测中, 至少应有 3 个浓度以上在浓度范围的内毒素标准稀释液以生成标准曲线。如果样品的内毒素浓度在 0.01-0.1 EU/mL 范围, 则建议内毒素标准溶液可以分别为 0.1、0.05、0.025 和 0.01 EU/mL。如果样品的内毒素浓度在 0.1-1.0 EU/mL 范围, 则建议内毒素标准溶液溶液可以分别为 1.0、0.5、0.25 和 0.1 EU/mL。阴性对照为 LAL 试剂水。建议每个浓度都设置 2~3 个平行管。

下图为制备系列内毒素标准溶液的示例。所有稀释步骤都应通过涡旋混合至少 30 秒。



## 3. 测试步骤

**注意: 反应过程中所有试剂用量、反应时间均不可调整。**

3.1 小心地将 100  $\mu$ L 标准品、样品和 LAL 试剂水分别加入到不同的无内毒素试管中, 并将它们标记为标准品 1、2、3、4, 样品 1、2 等和空白。

3.2 向每个试管中加入 100  $\mu$ L 复溶后的 LAL 并轻轻混合均匀。

3.3 如果内毒素浓度范围为 0.01-0.1 EU/mL, 使用水浴在  $37\pm 1^\circ\text{C}$  将所有样品瓶与架子一起孵育 T1。如果内毒素浓度范围为 0.1-1 EU/mL, 使用水浴在  $37\pm 1^\circ\text{C}$  孵育 T2。T1 和

T2 请参考试剂盒上的标签。注：孵育时可用铝箔纸（试管包装纸）覆盖管口防止空气中浮尘等异物或者冷凝水进入试管。

3.4 T1/T2 孵育结束后，迅速向每个试管中加入 100  $\mu\text{L}$  显色底物溶液并轻轻混合。请勿摇晃或倒置涡旋以避免起泡，然后迅速在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴中继续孵育 6 分钟。注：孵育时可用铝箔纸（试管包装纸）覆盖管口防止空气中浮尘等异物或者冷凝水进入试管。

3.5 6 分钟孵育结束后，迅速向每个试管中加入 500  $\mu\text{L}$  新鲜配制的终止液（偶氮试剂 #1）并轻轻旋转以充分混合。不要摇晃或颠倒涡旋以避免起泡。然后将 500  $\mu\text{L}$  偶氮试剂#2 加入每个试管中并混合均匀。最后将 500  $\mu\text{L}$  偶氮试剂 #3 加入每个试管中。轻轻旋转每个试管，充分混合 3 秒钟。避免起泡。

3.6 读取试管中液体在 545 nm 处的吸光度。使用蒸馏水作为空白将光度计调零。

3.7 也可以通过 Microplate Reader 读取，将 200  $\mu\text{L}$  最终溶液转移到 96 孔板中以读取 545 nm 处的吸光度。

	Standards	Samples	Blank
Standards ( $\mu\text{L}$ )	100	-	-
Samples ( $\mu\text{L}$ )	-	100	-
LAL Reagent Water ( $\mu\text{L}$ )	-	-	100
LAL ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
Mix well and incubate at $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$	T1 or T2	T1 or T2	T1 or T2
Substrate solution ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
Mix well and incubate at $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ (min)	6	6	6
Color-stabilizer #1 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500
Color-stabilizer #2 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500
Color-stabilizer #3 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500

混合均匀后在 545 nm 波长下读数

## IV. 案例

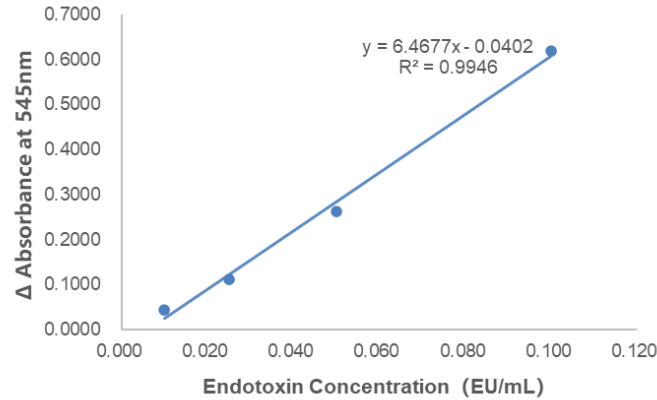
在标准条件下，545 nm 处的吸光度在 0.01-0.1 EU/mL 和 0.1-1 EU/mL 范围内与浓度呈线性关系。在 x 轴上对应的内毒素浓度（单位为 EU/mL），y 轴对应四个标准品的吸光度  $\Delta$  **Absorbance**，在这些点之间画一条最合适的直线，并以此曲线公式计算样品的内毒素浓度。

示例使用的数据如下：

Tube No.	Sample	Absorbance 545nm	at	$\Delta$ Absorbance
1	LAL reagent water (Blank)	0.0525	-	-
2	0.01 EU/mL Standard	0.0965		0.0441
3	0.025 EU/mL Standard	0.1650		0.1125
4	0.05 EU/mL Standard	0.3139		0.2614
5	0.1 EU/mL Standard	0.6702		0.6177

5

Standard Curve for Quantification of Endotoxin in Chromogenic Assay



如果样品的平均吸光度为  $y$ ，则样品的内毒素浓度 ( $x$ ) 与样品的平均吸光度的关系为  $y = 6.4677x - 0.0402$ 。上图仅为示例曲线，标准品的 OD 值可能因化验不同而有所差异。

**注意：标准品的稀释度、孵育温度和孵育时间是影响吸收值的关键因素，确保内毒素标准品完全溶解很重要，孵育温度应严格保持在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，孵育时需要注意尽可能缩短加液时间**

## V. 性能特征

### 线性

必须验证用于测量内毒素值的浓度范围内标准曲线的线性。应至少包含 3 个覆盖预期浓度范围的内毒素标准品和空白样品。标准品吸光度与其相应内毒素浓度的相关系数  $|R| \geq 0.980$ ，等同于  $R^2 \geq 0.96$ 。

### 重现性

标准品稀释液、样本的重复，变异系数 (C.V.) 应小于 10%。

### 常见问题答疑

问题	可能原因	建议
标准曲线不成线性	内毒素标准品涡旋不充分	加入适量 LAL 试剂水复溶后，置于涡旋混匀器上至少混匀 15 分钟，建议使用自动涡旋设备进行涡旋。
	过度反应或反应不足	严格控制加样时间，加样时从低内毒素浓度向高内毒素浓度依次进行；孵育时尽量使用水浴方式，勿使用烘箱。
空白对照 OD 高于内毒素标准品	实验操作过程中引入外部污染	检测人员应采用无菌操作以防止样品污染，确保实验室干净整洁。

“了解更多产品信息，请关注金斯瑞目录产品公众号”



**For research and manufacturing use. Direct human use, including taking orally and injection are forbidden.**

生产商：南京金斯瑞生物科技有限公司 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路 28 号

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China