

Version: 03
Update: 07/07/2023

ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay Kit Cat.No.L00351

I. 使用说明

GenScript ToxinSensor™ Gel Clot 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 β -葡聚糖的样品检测， β 葡聚糖会引发 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性分析方法，可简单灵敏地检测样品中是否存在脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）。试剂盒中提供的冻干变形细胞裂解液要用 LAL 试剂水复溶，然后与待测溶液等份混合。孵育适当时间后，在内毒素存在的情况下，形成凝胶；在没有内毒素的情况下，不会形成凝胶。该试剂盒中鲎试剂灵敏度为 0.25 EU/mL。

特征

- 良好的重现性
- 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

产品组分名称 (40 rxns)	数量
LAL, 0.25 EU/mL, 2.2 mL/ vial	2 vials
LAL Reagent Water, 50 mL/bottle	2 bottles
<i>E. coli</i> Endotoxin Standard	2 vials
Endotoxin-free tubes	5 vials x 17
Endotoxin-free Tips, 200 μ L	1 box (96 tips)
Endotoxin-free Tips, 1000 μ L	2 bags (12 tips)
Incubation Rack	1

II. 其他需准备材料及设备

- 0.1 M 氢氧化钠, 溶解在 LAL 试剂水中。必要时用于调节供试品 pH 值
- 0.1 M 盐酸, 在 LAL 试剂水中稀释。必要时用于调节供试品 pH 值
- 水浴或内毒素凝胶测定仪, 设置在 37 ± 1.0 °C
- 涡流混合器
- 计时器

储存条件

L00351 需储存在 2-8 °C。不要冷冻试剂盒或其任何组分。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. 实验步骤说明

1. 样品预处理及注意事项

1.1 样品准备

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。供试品必须以阻止所有细菌活动的方式储存。例如, 建议使用前 24 小时内可以储存在 2-8 °C, 但长期使用需冷冻保存。如果供试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。

1.2 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。

1.3 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, 供试品的 pH 值应在 pH 6-8 (18–26 °C) 以确保可靠的结果。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。

1.4 MVD (最大有效稀释倍数)

通过内毒素限度 (单位为 EU/mL) 除以鲎试剂灵敏度 λ 计算得出的稀释系数。当供试品中估计的内毒素水平非常高时, 可在检测前稀释。稀释系数由 MVD* 决定。为获得最佳结果, 请勿超过 MVD。

2. 试剂准备

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。

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。

稀释: 上述内毒素标准品溶液可用 LAL 试剂水进一步稀释成各个不同的浓度梯度，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: 如稀释的内毒素标准品溶液静置时间超过 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。

2.2 鲎试剂 (LAL)

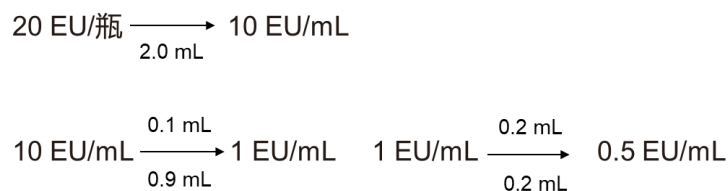
加入 2.2 mL LAL 试剂水，复溶冻干粉。轻轻翻转溶解，避免起泡，然后放置 30 秒，此时液体会逐渐变澄清。如果复溶后在 -20°C 无菌条件下储存，可以稳定保存 1 周，不建议储存更长时间。该试剂必须在 **10 分钟内用完或存放**。避免反复冻融。请勿使用吹打、涡旋、加热和超声波等剧烈方法溶解 LAL，这可能会影响其稳定性和灵敏度。

2.3 鲎试剂灵敏度复核

当使用新批次的鲎试剂或者试验条件改变可能影响检验结果时，需要根据《中国药典》2020 版细菌内毒素检查法进行鲎试剂的灵敏度复核实验。复核时需使用细菌内毒素国家标准品或试剂盒中匹配批次的细菌内毒素工作标准品进行。当复核结果 λ_c 在 $0.5\lambda - 2\lambda$ 之间，均认为标识的灵敏度值是准确的。

2.4 阳性对照

阳性对照一般为 2λ ，这里 $\lambda = 0.25$ EU/mL，故使用 $2\lambda = 0.5$ EU/mL 的内毒素溶液作为阳性对照。例如，上述得到的内毒素原液为 20 EU/mL，则用 LAL 试剂水稀释该制成 0.5 EU/mL 溶液，如下图所示。每一步稀释液应使用涡旋彻底混合 30 秒，每次稀释不得超过 10 倍。注意使用试剂盒内匹配批次的内毒素工作标准品或外购细菌内毒素国家标准品作为阳性对照。标准稀释过程注意封闭管口防止液体溅出。



箭头上方为加入作为母液的内毒素标准品溶液的量，下方为加入的 LAL 试剂水的量。

2.5 阴性对照

LAL 试剂水可用作阴性对照。

2.6 供试品阳性对照

含有 0.5 EU/mL 的内毒素标准品溶液的供试品。

2.7 供试品

待测样品。

3. 测试步骤

注意：通常情况，每个反应需要设置至少 2 组平行确保可靠的结果。如果使用的是水浴，可以在孵育时用锡箔纸覆盖管口。

- 3.1 小心地打开无热源试管外面的锡箔纸包装，注意避免微生物和内毒素污染。
- 3.2 小心地将 0.1 mL 的 LAL 试剂分配到无内毒素的试管中。
- 3.3 小心地将 0.1 mL 阳性对照、阴性对照、供试品阳性对照和全部供试品转移到步骤 3.2 中的 LAL 试剂中，轻轻摇晃 3 - 5 次混合。
- 3.4 在 37 ± 1 °C 的水浴或内毒素凝胶测定仪中孵育所有试管。孵育时保持试管直立，避免震动。
- 3.5 孵育 60 分钟后取出，轻轻倒置每个试管并检查是否形成凝胶。
- 3.6 检查时不要剧烈摇晃或来回翻转，这可能会破坏凝胶状态。
 - a) 阳性反应的特征是形成牢固的凝胶，当小瓶倒置时，该凝胶保持完整。
 - b) 阴性反应的特征是不存在固体凝块。试剂浊度增加但仍可流动，视为是阴性结果。
- 3.7 当阴性对照不凝胶，阳性对照及供试品阳性对照形成凝胶时，实验结果有效。如果阴性对照凝胶，则可能是环境或所使用的耗材有污染引入。如果阳性对照不形成凝胶，则可能是鲎试剂失效、内毒素标准品效价降低或其他稀释或孵育操作过程引入的异常。如果供试品阳性对照不形成凝胶，则可能是体系有干扰。
- 3.8 内毒素水平的判定：本试验中可对供试品进行一系列稀释，同时进行测试。当供试品管结果呈阳性，则指示内毒素水平等于或高于 0.25 EU/mL；当供试品管结果呈阴性，则指示内毒素水平低于 0.25 EU/mL。如果供试品是经过稀释处理的，则其结果乘以稀释倍数，即为原样内毒素水平。

4. 案例

1. 样品：通过 Ni-NTA Resin 从大肠杆菌裂解物中纯化蛋白 A（1 mg/mL，溶于 PBS，pH 7.4），确认该样品不存在任何干扰因素，未设置供试品阳性对照。
2. 使用 LAL 试剂水进行稀释：1: 200,000, 1: 400,000, 1: 800,000
3. 测试按上述步骤进行，检测结果如下表：

Positive control	Negative control	1: 200,000	1: 400,000	1: 800,000
+	-	+	-	-

4. 本样品内毒素浓度为：200,000×0.25 EU/mL ~ 400,000×0.25 EU/mL，即 50,000 ~ 100,000 EU/mL。

5. 相关产品

Cat. No.	Products	Quantity
L00338	ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit	1 kit
L00402	ToxinEraser™ Endotoxin Removal Resin	1 mL
M01053	ToxinEraser™ Regeneration Buffer	125 mL
M01054	ToxinEraser™ Equilibration Buffer	125 mL
M01063	ToxinSensor™ Endotoxin-free Pipette Tips (1 mL, Blue)	1PK of 6 Tips
M01072-5	ToxinSensor™ Endotoxin-free Tubes	5 Tubes
M01072-10	ToxinSensor™ Endotoxin-free Tubes	10 Tubes
M01072-40	ToxinSensor™ Endotoxin-free Tubes	40 Tubes
L00856-20	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.03 EU/mL	20 assay
L00856-40	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.03 EU/mL	40 assay
L00857-20	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.06 EU/mL	20 assay
L00857-40	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.06 EU/mL	40 assay
L00858-20	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.125 EU/mL	20 assay
L00858-20	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.125 EU/mL	40 assay
L00859-20	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.25 EU/mL	20 assay
L00859-40	ToxinSensor™ Single Tests Kit with Standard, 0.25 EU/mL	40 assay

常见问题答疑

问题	可能原因	建议
阳性对照不凝胶	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。
	内毒素标准品与 LAL 不匹配	使用同一批次试剂盒中的内毒素标准品
	内毒素标准品储存不当或反复冻融, 导致其效价降低	重新配制配套的内毒素标准品
阴性对照凝胶	实验操作过程中引入外部污染	检测人员应确保实验室干净整洁, 采用无菌操作以防止样品污染。

“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