



产品使用说明书

Rhinogen[®] 重组鲎试剂内毒素检测 试剂盒

货号：RAF-03



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
保藏条件	2
产品信息	3
背景	3
概述	3
特性	3
产品信息	5
需要的耗材及设备（需自备）	5
检测方法	5
溶解内毒素工作标准品	5
背景	5
测定仪器的设置	5
加样至测定板	6
操作说明	6
相关产品	7
联系我们	8

产品信息

试剂包装 Rhinogen® 重组鲎试剂内毒素检测试剂盒包装规格如下：

试剂盒组分	货号	规格
	RAF-03	2*30T
重组鲎试剂冻干粉	RAF-03A	2vials
复溶缓冲液	RAF-03B	2vials
无热原水	RAF-03C	2vials

保藏条件 采用冰袋运输。收到试剂盒后，请立即置于2℃~8℃储存。

产品综述

背景

临床输液反应以热原反应危害最大，发生率最高。内毒素（即革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖分子，lipopolysaccharide, LPS）是研究最透彻也是最常见的生物热原，注射即使是pg级别的内毒素，也会导致病人严重的热原反应，引起人体发热、休克甚至死亡。内毒素普遍存在且不易灭活，对制药和医疗器械行业是一个挑战。因此，灵敏可靠的内毒素分析技术是非常必须的。

自1970年代起鲎试内毒素检测方法开始应用于医药领域，很快被世界各国广泛采用并将其定为法定的细菌内毒素检查法。传统鲎试剂分为凝胶法和光度法两种，而光度法又分为浊度法和显色法，其中以动态显色法的检测灵敏度范围最广，且能定量检测内毒素含量并能提供数据审计追踪记录。

动态显色法鲎试剂在内毒素存在下，其裂解物将开始裂解显色底物，导致溶液变黄。溶液变色所需的时间与存在的内毒素含量成反比。然后，可以从标准曲线来计算未知样品的浓度。但作为传统鲎试剂的一种，动态显色法鲎试剂依然存在因生产原料所无法避免的缺点。例如，非特异性干扰问题：鲎试剂除了能与内毒素反应外，还会与(1-3)- β -D-葡聚糖反应，造成假阳性结果。再比如，批次稳定性问题：鲎试剂采用海鲎血液作为生产原料，由于季节、地域等差异，使得鲎试剂的批次差异成为常见现象等。

随着生物技术的进步，重组蛋白生产技术逐步取代了天然提取技术。为了保护鲎资源，并能排除旁路G因子引起的非特异性干扰等传统鲎试剂的劣势，通过重组表达开发一种不依赖于动物鲎来源，同时能兼顾高灵敏度且可定量检测内毒素的的试剂盒更是目前的发展趋势。

概述

Rhinogen[®] 重组鲎试剂（Recombinant Cascade Reagent, rCR）采用基因重组技术表达鲎血细胞中的C因子（Factor C）、B因子（Factor B）和凝固酶原（Proclotting enzyme）；当重组C因子与内毒素结合并被激活之后，从而激活重组B因子，再由活化后的B因子激活重组凝固酶原，使其转变成具有生物活性的凝固酶，最后凝固酶识别并催化下游带显色基团的底物产生显色反应。显色反应的强度和内毒素浓度成正相关，从而定量检测内毒素。

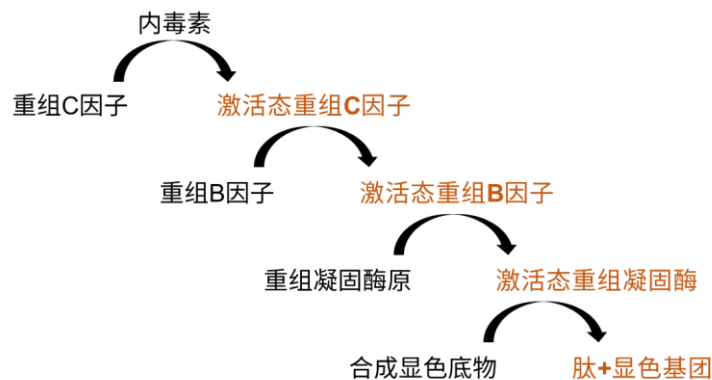


图1. Rhinogen[®] 重组鲎试剂内毒素检测试剂盒反应原理。

特性

Rhinogen[®] 重组鲎试剂内毒素检测试剂盒是一种不依赖于动物源性成分，灵敏度高、特异性高、可稳定且持续提供的内毒素测定产品，具有如下特性：

-
- ✓ 与动态显色法内毒素检测试剂操作流程一致，检测设备相同，分析方法一样；
 - ✓ 检测方便，单步复溶，试剂用量为100 μ l；
 - ✓ 检测时间只需60min；
 - ✓ 在96孔板中检测，操作方便，且高通量；
 - ✓ 灵敏度范围为0.005EU/ml~5EU/ml；
 - ✓ 内毒素特异性，无G因子旁路干扰，避免结果出现假阳性；
 - ✓ 消除了对动物源试剂的依赖，且符合3R的替代原则，提供更高的供应安全性；
 - ✓ 重组表达生产，产品批间一致性良好；
 - ✓ 本试剂盒可用于人用和动物用注射药物（如化学药品、放射性药物、抗生素类、生物制品等）及医疗器械（如透析液、植入式器械等）的原辅材料、中间产品、放行产品的内毒素检测。
-

操作方法

需要的耗材及设备 (需自备)

1. 一次性无热原安瓿瓶（用于内毒素工作标准品稀释）；
2. 单通道、八通道移液器；
3. 无热原、低吸附移液器吸头（推荐使用：QSP #Cat.TF112-1000-Q；TF140-200-Q）；
4. 一次性无菌无热原96孔板；
5. 无菌无热原试剂槽（可用一次性细胞培养皿代替）；
6. 漩涡振荡器；
7. 计时器；
8. 孵育吸光度酶标仪（405nm处测量吸光度）。

检测方法

本试剂盒通过阈值法来定量内毒素浓度：

确定达到阈值 OD所需的时间（称为起始反应时间）。内毒素浓度越高，起始反应时间越短。通过将起始反应时间对数（Y 轴）与标准浓度对数（X 轴）来绘制标准曲线，用于计算样品中的内毒素浓度。

溶解内毒素工作标准品

1. 在内毒素工作标准品（以下简称CSE）冻干粉中按照产品标签加入对应体积的无热原水，得到浓度为20EU/ml的溶液，漩涡震荡 $\geq 15\text{min}$ ；
2. 建议用户按照细菌内毒素工作标准品厂家所提供的产品说明书进行使用；
3. 内毒素工作标准品复溶后需混匀15分钟，后续每一步稀释都要混匀30秒；
4. 试验过程中使用到的移液管或者移液器枪头需要润洗、吹打3次。

注：1）每次移液步骤都要使用新的移液器吸头，以避免污染剩余试剂；

2）配制后未使用的内毒素工作标准品可于2-8℃储存两周；

3）配制后冷藏的内毒素工标准品，取出使用前需漩涡震荡 $\geq 15\text{min}$ ，平衡至室温后方可用于检测。进行稀释之前应将用于稀释的上一浓度内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡（1400rpm） $\geq 2\text{min}$ ，如在准备制备5EU/ml内毒素标准品时，先将20EU/ml内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 $\geq 2\text{min}$ ；在准备制备0.05EU/ml内毒素标准品时，先将0.5EU/ml内毒素工作标准品溶液充分漩涡震荡 $\geq 2\text{min}$ 。

内毒素工作标准品制备

用溶解至20EU/ml的内毒素工作标准品溶液制备系列内毒素标准品溶液，稀释方法建议如下：

内毒素标准品浓度 (EU/ml)	无热原水加量 (ml)	内毒素工作标准品加量 (ml)
5	0.75	0.25ml 20EU/ml 溶液
0.5	0.9	0.1ml 5EU/ml 溶液
0.05	0.9	0.1ml 0.5EU/ml 溶液
0.005	0.9	0.1ml 0.05EU/ml 溶液

测定仪器的设置

检测时软件设置如下表：

参数	设置
震荡	10s
读数	吸光度
波长	405nm
读数频次	30s 一次
读数时长	60min

注：预热仪器，设置孵育温度为 37°C。

加样至测定板

1. 将 100 μ l 阴性对照（无热原水）、内毒素工作标准品溶液、样品（两组，即样品 A 组和样品 B 组）分别加入到无菌无热原 96 孔板的相应孔中，通常需要两复孔或三复孔。在样品 B 组的孔中加入 10 μ l 的 5 EU/mL 内毒素工作标准品溶液作为加标样品组；
 2. 重组鲎试剂的配置：吸取复溶缓冲液至重组鲎试剂冻干中，轻轻摇晃或用除热原吸头吹打使重组鲎试剂完全混匀；
- 注：溶解后的重组鲎试剂应在 20 分钟内使用。
3. 用移液器或多道移液器每孔加入 100 μ l 重组鲎试剂（避免产生气泡），放入酶标仪中按照设定参数读数。

操作说明

- ✓ Rhinogen® 重组鲎试剂内毒素检测试剂盒仅用作样品的体外内毒素检测，不能用于临床诊断和治疗；
- ✓ 内毒素检测过程中与测定试剂接触的耗材务必使用明确无菌无热原产品，避免污染测定试剂；
- ✓ 采用低吸附移液吸头；
- ✓ 采用合适的校准移液器，尽可能保证所有小体积液体的精确转移；
- ✓ 每次使用新的移液管或者移液器枪头需要先润洗 3 次；
- ✓ 不同批次的试剂不得混合后使用。

相关产品

产品名称	货号
重组 C 因子内毒素检测试剂盒（含内毒素工作标准品）	RAF-01
重组 C 因子内毒素检测试剂盒（不含内毒素工作标准品）	RAF-02
无热原水	RAF-01E-06
Tris 缓冲液	RAF-01F-06
10mM 氯化镁溶液	RAF-01G-06
96 孔平底微孔板（白底透明盖）	RA-HC01
96 孔平底可拆卸微孔板（白底透明盖）	RA-HC02

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话: [0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - 技术支持: techserv@rhinobio.com
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址 : www.rhinobio.com
电 话 : 0512-87663137
邮 箱 : techserv@rhinobio.com

