



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法)

产品编号	产品名称	包装
C0271S	内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法)	34次

产品简介:

- 碧云天研发生产的内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法), 即Kinetic Turbidimetric LAL Endotoxin Assay Kit, 是一种基于鲎试剂酶促凝集反应形成凝胶, 使反应液浊度(吸光度)增加的原理, 定量检测细菌内毒素(endotoxin)也称脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)的超高灵敏度、高稳定性、更宽检测范围的常用试剂盒[1, 2]。检测灵敏度下限可以低至0.01EU/ml, 上限可高达10EU/ml, 极大拓宽了高浓度范围的检测能力; 并且可以检测微量样品, 样品的体积可以仅为50微升或更小体积。
- 本产品与碧云天的内毒素检测试剂盒(鲎试剂一步显色法) (C0273)、内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法) (C0276)和内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法改进版) (C0278)相比仅需经过一步内毒素检测试剂与待测样品的混匀步骤, 缩短了操作时间, 并且检测灵敏度基本一致, 可低至0.01EU/ml, 而检测上限可达10EU/ml, 具有更宽的检测范围[3]; 但本产品需要使用酶标仪或其他带有温控孵育系统并可连续动态检测340nm、405nm或630nm处波长吸光度的光学检测仪器。对于样品自身有一定颜色的情况, 优先推荐使用内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法) (C0276)或内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法改进版) (C0278)。
- **本试剂盒首次启用后, 适当保存至少在2个月内有效。**基于鲎试剂的内毒素检测试剂盒, 通常只能配制后立即使用, 导致试剂盒的浪费。本试剂盒经过精心优化, 确保首次配制成溶液后, 按照说明书推荐的方法保存, 至少2个月内有效。
- **本试剂盒操作简单便捷, 样品需求量少, 灵敏度高, 检测范围宽。**本试剂盒操作简单快速, 检测试剂直接加入到待测样品中并混匀, 即可进行37°C孵育和吸光度连续动态检测, 从而实现简单、快速、高灵敏地检测内毒素含量; 样品需求量少, 每个反应体系仅需50μl或更小体积的待测样品; 检测灵敏度高、测定样品的线性范围宽, 检测内毒素浓度范围为0.01-10EU/ml [1, 2]。
- **用途:** 溶液样品中内毒素污染检测; 注射用药物、生物制品和医疗器械产品等各种不同类型样品中内毒素含量的定量检测。
- **原理:** 鲎试剂为鲎科动物东方鲎的血液变形细胞裂解物的冷冻干燥品(Lyophilized Amebocyte Lysate, LAL)或体外重组的同类试剂, 含有C因子、B因子、凝固酶原、凝固蛋白原等。在适宜的条件下(温度, pH值及无干扰物质), 内毒素激活C因子, 引起一系列酶促反应, 使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶, 进而导致反应液浊度即吸光度(OD值)的增加。待测样品内毒素浓度与反应液浊度或吸光度增加的速度成正相关, 与浊度或吸光度(OD值)上升某一预设限值(启动OD, 即起始OD与目标OD的差值)所需的时间(定义为启动时间T)成负相关, 启动时间的对数与内毒素浓度的对数成线性关系。鲎试剂动态浊度法就是根据此原理, 通过检测反应液浊度上升至某一预先设定的吸光度所需的反应时间, 或是检测反应液浊度增加的速度来定量测定样品中的内毒素浓度[1, 2]。
- **检测灵敏度高, 检测范围宽。**最低检测限可以达到0.01EU, 最高可达到10EU。具体的检测效果请参考图1。

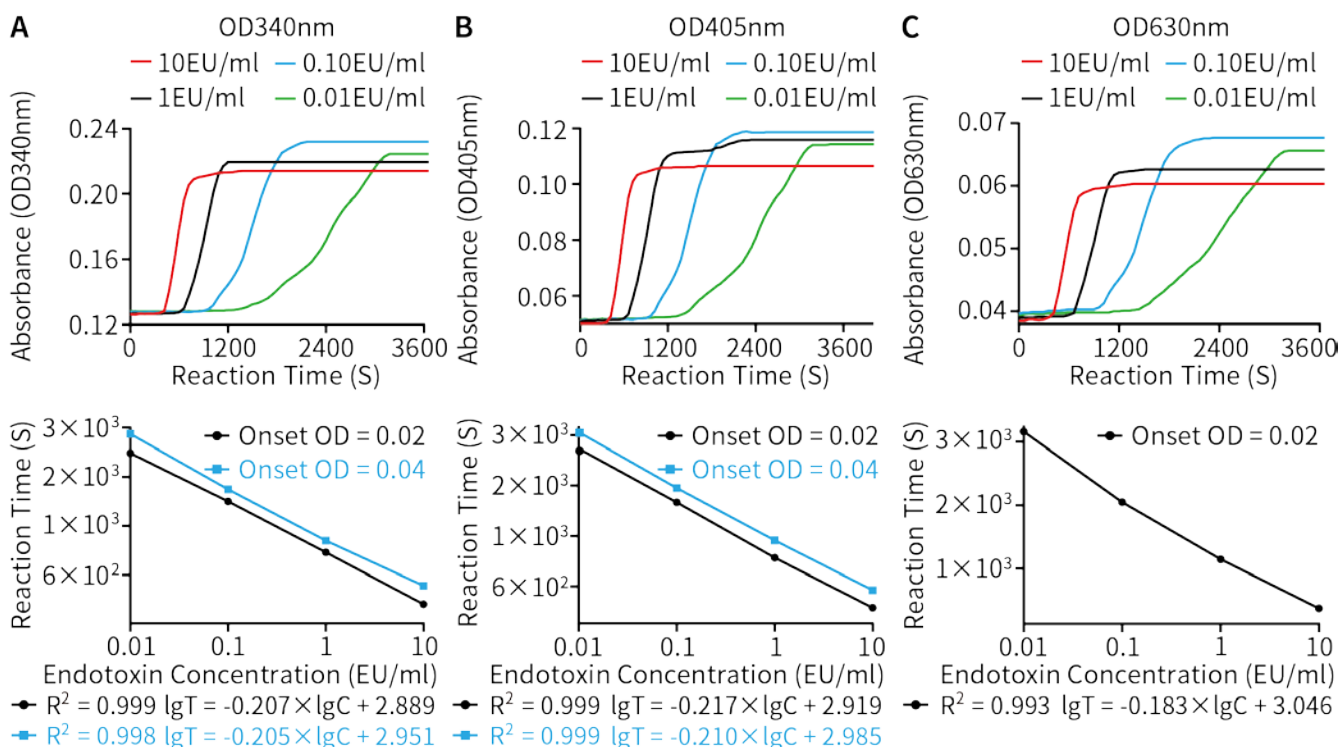


图1. 碧云天生产的内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法) (C0271)检测效果图。取配制好的下列浓度的内毒素标准品溶液：0.01、0.10、1.00、10.00EU/ml各50μl，用本试剂盒和BeyoGold™超低吸附96孔板(平底带盖，独立包装) (FULA961)进行检测反应及标准曲线的绘制。图A为在340nm波长条件下进行吸光度连续动态检测的效果及所绘制的标准曲线(启动OD分别设为0.02和0.04)；图B为在405nm波长条件下进行吸光度连续动态检测的效果及所绘制的标准曲线(启动OD分别设为0.02和0.04)；图C为在630nm波长条件下进行吸光度连续动态检测的效果及所绘制的标准曲线(启动OD设为0.02)。其中，样品内毒素浓度(C)为横坐标，孵育反应时间(T)为纵坐标，标准曲线由lgT和lgC拟合绘制而成。实际检测时会因检测仪器等实验条件的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

➤ 一个包装的本试剂盒共可以检测34个样品(含标准品)。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C0271S-1	内毒素标准品(100EU)	1管
C0271S-2	内毒素检测试剂	1瓶
C0271S-3	内毒素检测试剂配制液	3ml
C0271S-4	内毒素检测用水	50ml
—	说明书	1份

保存条件：

4℃保存，两年有效。内毒素检测试剂溶解后须立即适当分装，-20℃保存一周有效，经液氮速冻后-80℃保存至少两个月有效。内毒素标准品溶解后-20℃保存，至少6个月有效。

注意事项：

- 内毒素检测试剂溶解后很不稳定，需要尽量在10分钟内使用完毕或适当分装后保存。因此试剂盒在使用过程中需要预先做好各项准备工作，在需要加入内毒素检测试剂前再溶解内毒素检测试剂，或解冻之前分装冻存的内毒素检测试剂。
- 本产品所提供的内毒素检测用水请在首次开启后建议立即使用完毕，或务必在无内毒素实验条件下，使用无内毒素实验耗材对其适当分装并保存于-20℃。常规实验室条件下，反复多次取用同一容器中的内毒素检测用水，极易因环境因素造成内毒素的污染。
- 请务必使用首次开启的内毒素检测用水或分装后确保无内毒素污染的内毒素检测用水，或自行准备的确保无内毒素的超纯水进行内毒素检测所需试剂的溶解和配制，以免造成试剂的外源内毒素污染。
- 所有内毒素检测的实验过程均需在无内毒素条件下，使用无内毒素实验耗材进行，否则极易对内毒素检测造成干扰。
- 实验所用的器皿需经预处理，以去除可能存在的外源性内毒素，常用的方法是在250℃干烤至少60分钟，也可以采用其它确保不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器械，应选用表明无内毒素并且对实验无干扰的器械。
- 实验操作过程应防止微生物的污染。
- 溶解并稀释后的内毒素标准品溶液静置时间若超过10分钟，使用前应在旋涡振荡器上振荡混匀1分钟。冻存的溶解后的内毒素标准品，下次使用时须先充分溶解，并剧烈涡旋混合后使用。
- 本试剂盒中的内毒素检测试剂溶解后，须立即适当分装，-20℃保存一周有效，经液氮速冻后-80℃保存至少两个月有效。务必避免反复冻融。
- 内毒素检测所需试剂在溶解配制好后，如不能一次性使用完，请立即使用无内毒素的耗材进行分装冻存，随用随取。
- 同一管检测试剂在常规实验条件下多次反复取用后，也极易造成环境中内毒素的污染，建议根据实验需求对试剂进行适当分装。
- 推荐设置不添加待测样品的空白对照，以确认整个检测体系是否被环境中内毒素所污染。
- 样品的稀释和制备，推荐使用本试剂盒提供的内毒素检测用水或碧云天的无内毒素超纯水BeyoPure™ Ultrapure Water (Sterile, Endotoxin-Free) (ST878)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

以下所有实验操作均须在无内毒素条件下进行，推荐使用碧云天BeyoGold™系列无菌吸头，锥形离心管，平底、无色透明96孔板/384孔板，1.5ml离心管或PCR管等实验耗材进行体外内毒素含量的检测。

1. 待测样品的预处理及注意事项。

- 待测样品与内毒素检测试剂混合后溶液的pH值应在6~8之间，若超出此范围，需用不含内毒素的缓冲液、氢氧化钠或盐酸调节pH。
- 若待测样品中可能存在鲎试剂检测的干扰物质，处理方法参见本使用说明第4点‘待测样品的干扰实验’。
- 若待测样品中可能含有β-葡聚糖(β-葡聚糖会产生G因子旁路反应，干扰内毒素检测)，需选用特异性内毒素检测试剂。
- 若待测样品为一些抗菌素如头孢类抗菌素和磺胺制剂会干扰显色反应。
- 若待测样品的本底吸光度值大于0.5，必须对待测样品适当稀释后再检测。
- 请务必使用首次开启的内毒素检测用水或分装后确保无内毒素污染的内毒素检测用水，或者自行准备确保无内毒素的超纯水进行待测样品的稀释，以免干扰内毒素检测结果。
- 若待测样品颜色较深(例如溶血)，或在酸性条件下颜色加深(例如一些组织培养介质)必须设置待测样品空白管以扣除待测样品

自身的颜色本底。

- h. 待测样品空白管不加入内毒素检测试剂，以等体积溶剂(该处为内毒素检测用水)代替。其余操作同待测样品管。

注1：接触检测试剂及待测样品的所有器皿必须是无内毒素的。

注2：如需使用玻璃器皿，可经250°C干烤至少60分钟以去除内毒素后再进行使用。

2. 实验操作。

- a. 内毒素标准品溶液的配制。标准曲线所采用的内毒素浓度可为10倍或2倍等梯度稀释，如0.01、0.10、1.00、10.00EU/ml或0.0625、0.125、0.25、0.50EU/ml等。稀释方法如下(以0.01、0.10、1.00、10.00EU/ml为例)：取试剂盒提供的内毒素标准品1管(100EU)，确认内毒素标准品粉末在管子底部(推荐约10000g离心数秒)；加入1ml内毒素检测用水，静置约半分钟，反复抽吸数次后转移到一无内毒素1.5ml离心管内；放置于旋涡混匀器上振荡2-3分钟以充分溶解并混匀内毒素标准品。将上述配制好的100EU/ml内毒素标准品溶液按照下表进一步用内毒素检测用水逐步稀释为0.01、0.10、1.00和10.00EU/ml的内毒素标准品溶液。

内毒素浓度(EU/ml)	加入内毒素检测用水体积(ml)	加入内毒素溶液浓度(EU/ml)	加入内毒素溶液体积(ml)
10.00	0.9	100.0	0.1
1.00	0.9	10.0	0.1
0.10	0.9	1.0	0.1
0.01	0.9	0.1	0.1

注1：每稀释一步均应在旋涡振荡器上剧烈振荡至少20秒。

注2：若稀释好的内毒素溶液静置时间超过10分钟，需在旋涡混匀器上剧烈振荡1分钟以充分混匀后使用。

注3：配制好的低浓度内毒素标准溶液应在4小时内用完。

注4：为确保稀释的准确性，每一步稀释的稀释倍数不得超过10倍，且样品的吸取体积不小于10μl，即所配制的每种内毒素标准品溶液体积不小于100μl。

注5：请务必使用首次开启的内毒素检测用水或分装后确保无内毒素污染的内毒素检测用水，或者使用自行准备的确保无内毒素的超纯水进行内毒素标准品的配制，以免造成外源内毒素的污染，干扰检测结果。

注6：建议将配制好的内毒素标准品使用无内毒素的耗材进行分装保存，以免反复多次使用后造成环境内毒素的污染和干扰。

注7：由于本产品内毒素浓度的检测范围宽，为0.01-10EU/ml。因此，无需完全按照上述步骤进行内毒素标准品溶液的配制，可根据实际预估的待测样品内毒素浓度自行选择配制特定范围内不少于3个的内毒素标准品溶液，同时保证相邻浓度间稀释倍数不大于10倍，且配制的最低内毒素标准品溶液浓度不低于本产品的最低检测限，并进行相应范围内的内毒素标准曲线的绘制。

注8：内毒素标准品溶液建议现配现用；也可分装冻存于-20°C，随用随取，至少6个月有效。

- b. 阴性对照为内毒素检测用水。

- c. 内毒素检测试剂溶液的配制。在试剂盒提供的内毒素检测试剂瓶内加入1.7ml内毒素检测试剂配制液，轻轻混匀使其完全溶解，静置不少于20秒，即为内毒素检测试剂溶液。

注1：不可进行涡旋混合等方式激烈振荡，以避免检测试剂失活。

注2：溶解好的内毒素检测试剂溶液应尽量在10分钟内用完，否则可能会影响检测效果。

注3：如果溶解好的内毒素检测试剂溶液不会一次性全部用完，可以立即使用无内毒素的耗材进行适当分装，-20°C保存一周有效，-80°C保存至少两个月有效。

注4：请务必使用首次开启的内毒素检测试剂配制液进行内毒素检测试剂的溶解，溶解后立即使用或在无内毒素实验条件下分装冻存，以免造成外源内毒素的污染，干扰检测结果。

注5：内毒素检测试剂溶液在分装后，不宜反复多次取用同一管，否则极易造成环境内毒素的污染。因此，请根据实验所需，对内毒素检测试剂溶液进行适当分装后冻存，随用随取。

- d. 待测样品内毒素含量检测参照下表进行。

试剂	阴性对照	内毒素标准品	待测样品
内毒素检测用水(μl)	50		
内毒素标准品溶液(μl)		50	
待测样品(μl)			50
内毒素检测试剂溶液(μl)	50	50	50
混匀，37°C孵育并测定340、405或630nm吸光度，每30-60秒测定一次，连续测定1-2小时。			

具体操作步骤如下：

- (a) 将检测仪器，如酶标仪等，温度预热至37°C恒温，并预先设定好检测程序动力学参数：检测波长为340、405或630nm波长，每间隔30-60秒读取一次吸光度，连续检测1-2小时，同时也可设置启动OD(推荐设为0.02)。
- (b) 取无内毒素离心管、PCR管、BeyoGold™超低吸附96孔板(平底带盖，独立包装)(FULA961)或BeyoGold™超低吸附384孔板(平底带盖，独立包装)(FULA981)，加入50μl内毒素检测用水、内毒素标准品溶液或待测样品。
- (c) 再加入50μl内毒素检测试剂溶液，轻轻吹打混匀(切忌吹打过程中产生气泡，否则会影响吸光度检测的准确性)，或使用酶标仪中速振荡5-10秒左右以充分混匀反应液。
- (d) 使用酶标仪于37°C，在340、405或630nm波长处读取吸光度值，每间隔30-60s读取一次，连续检测1-2小时。

注1：本产品对内毒素的检测范围为0.01-10EU/ml，在此浓度范围内的样品通常连续检测1小时左右即到达吸光度平台，延长37°C的孵育和检测时间并不会影响样品的检测效果和测定准确性。

注2：以上混匀操作可通过轻晃离心管2~3次、轻轻吹打微孔板或使用酶标仪中速振荡微孔板等方式进行，无需漩涡振荡。

注3：须在37°C条件下进行吸光度的连续检测，请使用具有37°C恒温孵育及吸光度连续检测功能的仪器，如酶标仪等，进行待测样品的内毒素含量测定。

注4：建议先将检测仪器的温度设定为37°C恒温后，再进行反应液的配制，以免温度偏差或波动影响检测准确性。

注5：请务必在无内毒素的条件下，使用无内毒素的实验耗材进行内毒素检测的所有操作，以免造成试剂或样品污染，干扰实验结果。

注6：若同时检测的样品数目较多，建议步骤(b)-(c)中，使用碧云天生产的多道移液器或于冰上进行反应液的添加和混匀，随后将所有样品统一进行37°C的孵育和吸光度检测，避免因加样顺序、加样时间、样品孵育时间等因素导致样品间出现检测误差。

注7：参考上述步骤所配制的反应液终体积为100μl，也可根据实际待测样品体积及检测试剂用量等因素，自行按比例扩大或缩小反应液的配制体积。在反应液配制完成后，吸取适当体积反应液至BeyoGold™超低吸附96孔板(平底带盖，独立包装) (FULA961)或BeyoGold™超低吸附384孔板(平底带盖，独立包装) (FULA981)中进行吸光度的连续检测。在检测体积相同的情况下，使用384孔板进行检测的吸光度数值整体变化大于使用96孔板。

注8：在使用酶标仪或其他光学检测仪器进行检测程序的设置时，检测波长可设定为340、405或630nm(优先推荐使用340或405nm波长)，同时可预先设定好启动OD(推荐设为0.02)，在程序结束后即可直接获取启动时间(T)数据，用于标准曲线的绘制；如果检测程序中未设置启动OD，可在程序结束后，自行分析吸光度检测数据，计算样品吸光度由起始值(即起始OD)上升预设值(即启动OD，起始OD与目标OD的差值)所需的时间，设为启动时间(T)，并用于标准曲线的绘制。

3. 数据处理。

- a. 设定启动OD，即样品吸光度上升的某一预设值(起始OD与目标OD的差值)，通常推荐设为0.02。使用340nm和405nm波长进行吸光度检测时，启动OD设定为0.02-0.04之间均可；使用630nm波长进行吸光度检测时，由于其吸光度数值整体变化相对较小，启动OD通常推荐设定为0.02。吸光度达到启动OD所需的时间定为启动时间(T)。

注1：使用本产品在进行吸光度检测的过程中，吸光度数值通常在前期会处于相对稳定、无明显波动的平台期，此时可将吸光度检测的初始值或处于稳定平台期的吸光度数值作为起始OD；如果吸光度数值在检测前期出现较大的波动和变化，可视情况舍去此部分数据，并推荐选取处于较稳定平台期的吸光度数值作为起始OD，但启动时间还是从反应起始的时间开始计算。

注2：与使用340nm和405nm波长进行吸光度检测相比，在630nm波长处进行检测的吸光度整体变化差异相对较小，因此通常推荐将启动OD设为0.02；也可适当按比例放大反应体系，以增加吸光度变化差异。

注3：参考图1，在检测过程中，于340nm波长处检测的吸光度数值整体变化差异最大，405nm波长次之，630nm波长最小。

- b. 建立标准曲线： $\lg T = \lg C + a$ ，其中T为启动时间，C为内毒素的浓度，b为标准曲线斜率，a为Y轴截距。使用本产品进行反应及标准曲线的检测效果请参考图1。当检测数据同时满足如下三个条件时获得的检测结果才有效：

(a) 标准曲线的浓度点 ≥ 3 (相邻浓度间稀释倍数不得大于10)，标准曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.980$ 。

(b) 标准曲线最低点的T值小于阴性对照的T值。

(c) 待测样品的吸光度值在标准曲线的区间内。

4. 待测样品的干扰实验。

待测样品的干扰实验详见《中华人民共和国药典》2020版中《细菌内毒素检查法》‘光度测定法干扰实验’。具体操作步骤如下：

- a. 选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度(设为 λm)，作为待测样品干扰实验中添加的内毒素浓度。如使用0.01、0.10、1.00、10.00 EU/ml的内毒素浓度范围绘制标准曲线，可配制含浓度为0.1 EU/ml (即 λm)的内毒素的待测样品作为阳性对照，测量出该溶液的内毒素浓度，称为Cs。
- b. 测量出未添加外源内毒素的待测样品溶液内毒素浓度，称为Ct。
- c. 计算该实验条件下的回收率 $R = (Cs - Ct) / \lambda m \times 100\%$ 。
- d. 当R在50%-200%之间，则认为在此实验条件下待测样品溶液不存在干扰作用。
- e. 当R在50%-200%之外，需对待测样品进行系列稀释(稀释倍数不得超过最大有效稀释倍数MVD)或进行其它处理消除干扰，每一稀释溶液都需重复步骤a-c，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%的稀释倍数进行待测样品内毒素含量的检测。

注： $MVD = cL / \lambda$ ，该公式中L为待测样品的细菌内毒素限值；c为待测样品溶液的浓度，当L以EU/mg或EU/U表示时，c的单位需为mg/ml或U/ml，当L以EU/ml表示时，则c等于1.0 ml/ml。如需计算在MVD时的待测样品浓度，即最小有效稀释浓度，可使用公式 $c = \lambda / L$ ； λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度(EU/ml)或是在光度测定法中所使用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

常见问题：

1. 什么原因会造成标准曲线的检测效果不好？

有以下原因会影响标准曲线的制作：

- a. 本产品内毒素浓度检测范围为0.01-10.00 EU/ml。若使用内毒素标准品配制的内毒素溶液的浓度不在此范围内，则会影响标准曲线的准确度。
- b. 仔细阅读说明书，确保操作步骤无误，数据计算准确！
- c. 确定配制的内毒素标准品溶液是否充分振荡混合均匀。推荐使用漩涡振荡器对内毒素溶液进行振荡混匀。
- d. 确定内毒素检测试剂是否完全溶解并混匀。且内毒素检测试剂要在10分钟内用完，否则会影响检测效果。因此需先完成内毒素标准品溶液的配制工作和待测样品的准备工作，再溶解内毒素检测试剂。同时内毒素检测试剂溶解后需轻轻混匀并静置20秒再

进行使用。

- e. 精确控制反应液的配制时间。多个样品同时进行检测时，每一步均要求尽快完成加样操作，并避免污染。
- f. 精确控制孵育温度。推荐先将检测仪器如酶标仪，温度预热为37°C恒温后，再进行反应液的配制。

2. 如何检测内毒素含量未知的样品？

对于内毒素含量未知的样品的检测，需先做预实验大致确定样品中内毒素的浓度范围。本产品的检测范围为0.01-10EU/ml，建议配制最宽检测限的内毒素标准品溶液，即0.01、0.10、1.00、10.00EU/ml，进行标准曲线的绘制来确定样品内毒素浓度范围。如果检测出样品内毒素浓度超过标曲上限，则选择对样品稀释后再进行检测；若检测出样品内毒素浓度超过标曲下限，则选择使用碧云天生产的超滤管对样品进行浓缩后检测，或使用碧云天生产的具有更高灵敏度的内毒素检测试剂盒进行内毒素含量的检测。大致确定待测样品的内毒素浓度范围，并选用合适的标准曲线后，待测样品还需做干扰实验以验证实验的可靠性，具体操作请见使用说明中的第4点待测样品的干扰实验部分或参考中国药典中的相关描述。

3. 能否使用酶标仪连续检测反应中样品的吸光度？

可以。同时，建议在使用本产品进行内毒素浓度检测前，先将酶标仪温度设定为37°C，待反应液配制完成后直接使用酶标仪进行340、405或630nm波长下的吸光度连续检测，以免由于温度的波动和偏差影响检测准确性。

参考文献：

1. Remillard IF, Gould MC, Roslanskv PF, Novitskv TI. Prog Clin Biol Res. 1987;231:197-210.
2. Oishi H, Fusamoto M, Hatayama Y, Tsuchiya M, Takaoka A, et al. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1988 Aug;36(8):3012-9.
3. Lao HY, Lin QX, Yang M, Liang XL, Shi W, et al. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2006 Feb;26(2):242-4.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0221B	PBS (pH7.4, Low Endotoxin, Cell Culture Grade)	500ml
C0268S/M	Protein Endotoxin Removal Kit	200次/1000次
C0271S	内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法)	34次
C0273S	内毒素检测试剂盒(鲎试剂一步显色法)	200次
C0276S	内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法)	160次
C0278S	内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法改进版)	400次
ST876-100ml/500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST878-100ml/500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (Sterile, Endotoxin-Free)	100ml/500ml