

鲨试剂（凝胶法） 说明书

货号：1501108

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品简介

本品为海洋生物鲎的血液变形细胞溶胞物的冷冻干燥制品,内含能被微量细菌内毒素激活的凝固酶原(Proclotting enzyme)和凝固酶蛋白原(Coagulogen)。在适宜的条件下(温度、pH值及无干扰物质),细菌内毒素能激活鲎试剂中的凝固酶原,使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶。凝胶法鲎试剂是根据凝集反应所形成凝胶的坚实程度来限量检测细菌内毒素。

本产品用于细菌内毒素检查。

该试剂盒仅供研究使用,不可用于诊断。

■ 性状

本品为白色或类白色冻干块或粉末,在水中易溶。

■ 包装规格

10支/盒, 0.6 mL/支

■ 灵敏度

0.125 EU/mL

■ 储存条件及有效期

2-8°C储存,规定储存条件下24个月,具体详见试剂盒标签。

■ 试验准备

1. 确定供试品检测限是否符合该试剂盒灵敏度,选择对应的细菌内毒素标准品以及细菌内毒素检查用水。

2. 试验所用器皿须经250°C干烤至少30分钟或其他适宜的方法除去可能存在的外源性热原;若使用塑料器械,如微孔板和与微量加样器配套的吸头等,应选用标明无内毒素并且对实验无干扰的器械;试验操作过程应防止微生物的污染。

3. 水浴恒温器或干热恒温器,涡旋混匀器,试管架,计时器。实验开始前应把恒温器温度调到 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

■ 检验方法

1. 细菌内毒素标准品稀释

取细菌内毒素标准品(冻干品)1支,开启,按使用说明加入检查用水溶解后分步稀释至所需浓度备用。

如下稀释方法供参考:

起始浓度 (EU/mL)	1000	100	10	1	0.5	0.25	...
吸取量 (mL)	0.4	0.4	0.4	1.8	1.8	1.8	...
加水量 (mL)	3.6	3.6	3.6	1.8	1.8	1.8	...
终浓度 (EU/mL)	100	10	1	0.5	0.25	0.125	...

细菌内毒素标准品应按其使用说明书所要求的时间采用涡旋混匀器进行混匀。

2. 供试品稀释

当供试品需要控制的内毒素限值大于鲎试剂的灵敏度值时,需要用检查用水对供试品进行稀释,计算公式如下:

$$MVD = \frac{cL}{\lambda}$$

MVD: 供试品的最大有效稀释倍数

L: 供试品需控制的内毒素限值 (EU/mL)

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; L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时, c 的单位需为 mg/mL 或 U/mL。如供试品为注射用无菌粉末或原料药,则 MVD 取 1,可计算供试品的最小有效浓度:

$$c = \frac{\lambda}{L}$$

λ : 为凝胶法鲎试剂的标示灵敏度 (EU/mL),本产品灵敏度为 0.125 EU/mL。

举例:

某供试品需要控制的内毒素限值为 5 EU/mL,使用灵敏度 $\lambda=0.125$ EU/mL 的鲎试剂作为细菌内毒素检查。

$$MVD = \frac{5 \text{ EU / mL}}{0.125 \text{ EU / mL}} = 40 \text{ 倍}$$

即供试品最大可作 1:40 稀释后检查,根据干扰实验选择不超过 1:40 稀释的最适稀释倍数进行检查操作。若检查结果为阳性,表明该供试品的内毒素含量 ≥ 5 EU/mL,已超过限值;若检查结果为阴性,表明该供试品的内毒素含量 < 5 EU/mL,低于限值。

3. 检查操作

1) 取凝胶法鲎试剂(西林瓶装)2支,每支加入 0.6 mL 检查用水溶解,摇匀。

2) 取无热原试管 8 支,其中 2 支作供试品检查管,2 支作阴性对照管,2 支作阳性对照管,2 支作供试品阳性对照管。

3) 每支试管中加入 0.1 mL 复溶后的鲎试剂；在阴性对照管中加入 0.1 mL 检查用水，每支供试品检查管加入 0.1 mL 供试品；阳性对照管加入 0.1 mL 浓度为 2λ 的内毒素溶液，供试品阳性对照管加入 0.1 mL 含 2λ 内毒素的供试品。

4. 涡旋振荡试管 3-5s，垂直放入 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温器中孵育 60 ± 2 分钟，然后取出观察结果。反应管在孵育期间应避免任何的振动。

备注：复溶后的鲎试剂尽量在 10 分钟内使用。

■ 结果判断

1. 将反应管从恒温器中轻轻取出，缓慢倒转 180° 时，若管内形成凝胶，并且凝胶不变形，不从管壁脱落为阳性，记录为 (+)；未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性，记录为 (-)。保温和拿取反应管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

2. 阴性对照管必须是阴性，阳性对照管、供试品阳性对照管必须是阳性，否则实验结果无效。

■ 鲎试剂灵敏度复核试验

1. 根据鲎试剂灵敏度的标示值 (λ)，将细菌内毒素标准品用检查用水溶解，将其制成 2λ 、 λ 、 0.5λ 和 0.25λ 四个浓度的内毒素标准溶液。

2. 取凝胶法鲎试剂（西林瓶装）4 支，每支加入 0.6 mL 检查用水溶解，摇匀，然后将其混匀。

3. 取无热原试管 18 支，每支试管中加入 0.1 mL 复溶后的鲎试剂，取不同浓度的内毒素标准溶液分别与 0.1 mL 鲎试剂溶液混合，每个浓度 4 管重复；另外取 2 管加入 0.1 mL 检查用水作阴性对照，按本检验方法中“3.检查操作”进行检查。

4. 当最大浓度 2λ 管均为阳性，最低浓度 0.25λ 管均为阴性，阴性对照管为阴性时，试验方为有效。按下式计算反应终点浓度的几何平均值，即为鲎试剂灵敏度的测定值 (λ_c)。

$$\lambda_c = \text{antilg}(\Sigma X/n)$$

式中 X 为反应终点浓度的对数值 (\lg)；n 为每个浓度的平行管数。

5. 当 λ_c 在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ （包括 0.5λ 和 2λ ）时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度 λ 为该批试剂的灵敏度。

■ 干扰试验

当对新药或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时，必须进行干扰试验；当鲎试剂、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；当供试品中可能存在鲎试剂的干扰物质时，须进行干扰试验。

步骤如下：

1. 按下表制备溶液 A、B、C、D，使用的供试品溶液应为未检出内毒素且不超过最大有效稀释倍数（MVD）的溶液，按灵敏度复核试验项下操作。

编号	内毒素浓度/被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素浓度	平行管数
A	无/供试品	—	—	—	2
B	2λ/供试品	供试品溶液	1	2λ	4
			2	λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/检查用水	—	—	—	2

注：A 为供试品溶液；B 为干扰试验系列；C 为鲎试剂标示灵敏度对照系列；D 为阴性对照。

2. 只有当溶液 A 和阴性对照溶液 D 的所有平行管都为阴性，并且系列溶液 C 的结果符合鲎试剂灵敏度复核实验要求时，试验方为有效。

3. 当系列溶液 B 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时，认为供试品在该浓度下无干扰作用；其他情况则认为存在干扰。若供试品溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰，应将供试品溶液进行不超过 MVD 的进一步稀释，再重复干扰试验。

■ 注意事项

1. 本品为体外试验试剂，严禁用于人体。
2. 本品用于药品的细菌内毒素检查时，应遵循《中华人民共和国药典》细菌内毒素检查法的规定。
3. 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，本品的承装容器为玻

璃材质，在运输及使用过程中容易受外力作用导致破碎，请注意使用安全。发现漏气萎缩、发黄的请勿使用。

4. 以细菌内毒素国家标准品或工作标准品复核本品的灵敏度值，应为标示值的50%-200%。

生效日期：2024年09月19日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路1366号6号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189