

# 重组因子 C 内毒素检测试剂盒

规格 : 48 次测试/ 96 次测试

货号 : RES-A056

重要提示:在进行实验之前,请仔细阅读本手册。

仅供研究使用。不可用于诊断或治疗程序

## 目录

重组 C 因子内毒素检测应用.....	1
试剂特色.....	1
注意事项.....	1
背景.....	2
检测原理.....	2
产品组份.....	3
需要但未提供的实验仪器与耗材.....	3
储存和有效性说明.....	4
实验前的准备.....	4
实验步骤流程简图.....	5
实验步骤.....	6
典型数据.....	14
常见问题与解答.....	17

## 重组 C 因子内毒素检测应用

重组因子 C 内毒素检测试剂盒是非动物源性内毒素检测试剂盒,用于生产过程中的质量控制,以及注射药物、生物制品、输注细胞、医疗器械和组织培养基等的最终产品内毒素定量检测。

本试剂盒仅供研究使用,不适用于人类或动物的临床诊断,血液或血液制品的鉴定。

## 试剂特色

- 与 LAL 方法相当 - 终点荧光测定,与其他显色定量 LAL 方法具可比性。
- 高特异性 - 与 LAL 检测不同,由于重组 C 因子检测试剂盒中不存在 G 因子,不会因  $\beta$ -葡聚糖激活而出现假阳性结果。
- 准确性 - 试剂盒中内毒素标准品相对于 USP 标准品(货号:1235503)的可追溯性。
- 快速获得结果 - 1 小时。
- 高灵敏度 - 灵敏度范围为 0.005-5 EU/mL。
- 广泛的验证 - 根据欧洲药典 11.0 和 USP 第 <1225> 章中列出的参数,对多重生物制品、荧光酶标仪和各种缓冲系统进行验证,对特异性、灵敏度、精密度、准确性、适用性和其他方面进行全面验证。
- 可持续资源 - 摆脱对动物源性试剂依赖,减少对马蹄蟹资源的依赖和捕捞压力,实现长期供应。
- 良好的批次间一致性 - 由于使用基因重组技术进行生产,保证了产品的批次一致性。

## 注意事项

- 一. 该试剂盒仅供研究使用,不可用于诊断或治疗应用。
- 二. 应根据提供的说明使用该套件。
- 三. 请勿混合不同批次的试剂。
- 四. 使用前将所有试剂和样品置于室温 (20 - 25° C)。
- 五. 该试剂盒应储存在 2 - 8° C 下。
- 六. 请根据实验要求准备各组分的工作溶液。所有制备的工作溶液仅供一次性使用,不能储存。
- 七. 内毒素检测过程中使用的试剂和耗材必须明确规定无菌且无热原,以避免污染检测试剂。

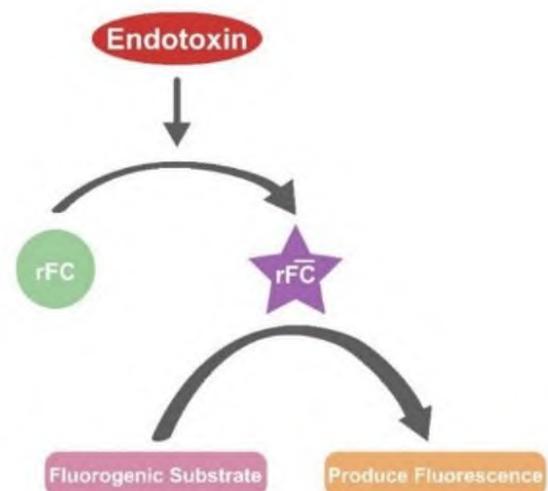
## 背景

内毒素,也称为脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外膜的成分,在完整细菌破坏(死亡、细胞裂解)后释放到周围环境中。内毒素进入体内会导致生物体出现高烧、血管舒张、腹泻症状,在极端情况下会导致致命性休克。因此临床使用的生物制剂,对于工艺过程中的原材料、生物制品、医疗器械等,内毒素含量是此类产品的重要质量控制指标,也影响产品能否放行。因此,开发灵敏、准确和快速的内毒素检测方法至关重要。

鲎试剂检测法(LAL)作为一种广泛应用的体外内毒素检测工具,其历史可追溯到数十年前,主要基于鲎血液中特殊成分与内毒素反应形成凝块的独特特性。然而,随着科学技术的发展和对鲎资源保护意识的增强,该方法不同批次、不同来源的鲎试剂可能存在敏感性和特异性的差异,影响检测结果的稳定性和准确性。随着对鲎资源的需求增加和捕捞压力加大,鲎的数量急剧减少,给鲎试剂的生产带来了巨大挑战。为了改善鲎试剂检测之缺点及保育鲎野生族群数量,现发展并采用重组 C 因子(rFC)测定法作为 LAL 的替代方法。

## 检测原理

重组因子 C 内毒素检测试剂盒为利用重组技术进行内毒素检测的新方法。重组因子 C 是马蹄蟹凝血级联反应的初始酶,在暴露于内毒素时,可与内毒素特异性结合而转为活化态。激活的重组 C 因子可裂解荧光底物,从而产生荧光信号。荧光信号的增加与内毒素的量之间存在正相关。在实验不透明的 96 孔板上进行,在开始时(时间零)和 37°C 孵育 1 小时后进行荧光测量。使用荧光酶标仪在 380/440 nm 的激发/发射波长下进行测量,以评估样品是否被内毒素污染。



图一、实验原理图

## 产品组份

组份编号	组份名称	规格 (次测试)		物理状态	存储条件
		48	96		
RES056-C01	Bacterial Endotoxin Standard	1 vial		粉末	2-8°C
RES056-C02	Recombinant Factor C Protein	48 Tests	96 Tests	粉末	2-8°C
RES056-C03	Fluorogenic Substrate	48 Tests	96 Tests	粉末	2-8°C
RES056-C04	Water for Bacterial Endotoxins Test	50 mL		液体	2-8°C
RES056-C05	96 well plate	1 set		固体	室温

## 需要但未提供的实验仪器与耗材

项目	应用要求	推荐仪器/耗材
单通道和八通道移液器	必须经过校准的移液器,并在实验期间保持无菌	不同的移液器有不同的精度,选择合适的精密移液器
无内毒素吸头	无内毒素、低吸附的移液器吸头	所有的吸头都要适配于移液器。对于传统的锥形套柄移液器,建议使用锥形接口的吸头,例如 QSP 的吸头(货号 TF112-1000-Q 或 TF140-200-Q 等),对于圆柱形套柄的移液器,建议使用专用配备的吸头,例如瑞宁专利的圆柱型移液器应使用适配的专用吸头。
玻璃管	无内毒素。用于稀释内毒素、工作标准品或待测样品。	-
试剂储液槽	无内毒素	例如,Biofil 试剂储液槽(Cat.No. LTT-011-050)或同等产品
定时器	-	-
涡旋混合器	用于玻璃管中混合试剂	-
恒温培养箱	用于微孔板的恒温孵育反应	-
96 孔荧光微孔板检测仪	读板器能够测量激发/发射波长为 380/440 nm 的荧光。	例如,BMG Labtech Clariostar Plus、BMG Omega、Agilent BioTek Synergy LX Multi-Mode Reader 或同等仪器

## 储存和有效性说明

- 一. 该试剂盒在蓝冰条件下运输,收到后应储存在 2-8°C 下。
- 二. 有效期显示在外包装上。不应使用过期的试剂。

## 实验前的准备

一. **实验环境准备** : 为保证实验的准确性,实验环境要求操作过程不引入额外的内毒素。如果不确定开放式实验室环境是否能满足要求,可以在超净工作台上进行实验操作。

二. **荧光酶标仪荧光计参数设置** :

模式	参数设置
激发/发射 (ex/em)	380/440 nm
增益值(Gain)	<p>荧光信号通常记录为相对荧光单位(RFU)。由于真实的荧光信号被转换为电子信号,该电子信号可使用增益设置或灵敏度设置进行调整,因此 RFU 是一种任意单位。不同型号酶标仪不同增益下检测荧光信号具体数值不同,具体应根据设备调整参数,若最低浓度值信号很弱,建议调高增益值,若背景信号值太高,建议调低增益值,建议参阅酶标仪用户手册中的说明。</p> <p>例如 BMG CLARIOstar Plus, BMG Omega 在固定 Gain 值模式下的荧光范围是 0-260000,建议最高浓度点的 RFU 值不超过最大值 260000 的 80%,以免信号溢出,即最高浓度点的 RFU 值不要超过 208000;如果对信号值没有特殊要求,在仪器有自动校准 Gain 值的模式下,也可以根据需要进行选择自动校准模式,这样可以保证信号值不会溢出仪器侦测上限。</p> <p>注意:不同仪器的设置方法可能不一致,详情请咨询仪器供应商。在实验开始前需要设置合适的仪器参数。</p>

三. **材料准备** : 为您的实验准备材料和设备,请参阅第 3 页需要但未提供的试验仪器与耗材。

四. **试剂制备** : 自 2-8°C 储存环境下取出试剂盒,让所有缓冲液组分平衡至室温。

## 实验步骤流程简图

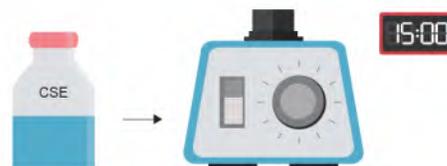
### Step 1

在内毒素工作标准品(以下简称CSE)中加入螯试剂检查用水(以下简称LRW),得到浓度为20EU/ml的溶液。



### Step 2

漩涡震荡15分钟。



### Step 3

在试管上贴上标签,标明内毒素浓度。在5.0 EU/ml试管中加入0.75 ml LRW。在其余试管中各加入0.9 ml LRW。



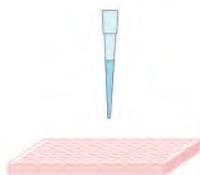
### Step 4

制备一系列内毒素标准品。

Tubes/ solution Code	Endotoxin Standards Stock Solution	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating	250 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	
Solution Conc.	20 EU/mL	5 EU/mL	0.5 EU/mL	0.05 EU/mL	0.005 EU/mL	0 EU/mL
Water Vol.		750 $\mu$ L	900 $\mu$ L	900 $\mu$ L	900 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

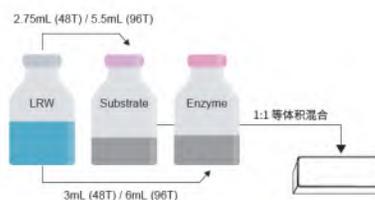
### Step 5

加入样品,标准品,以及空白对照和阳性对照等,100  $\mu$ L每孔。



### Step 6

配制底物/酶混合试剂。



### Step 7

加入底物/酶混合试剂,100  $\mu$ L每孔。



### Step 8

700 rpm/min, 20s;读取0小时的荧光信号。  
37°C孵育1小时;读取1小时的荧光信号。



## 实验步骤

### 一. 制备细菌内毒素标准品的储备液

首先,制备 20 EU/mL 内毒素储备液。按照分析证书 (COA) 的规定,加入指定的细菌内毒素检测用水 (RES056-C04) 体积,复溶细菌内毒素标准品 (RES056-C01),得到 20 EU/mL 储备液。由于长时间储存可能导致内毒素吸附到玻璃管壁上,因此加水后,在涡旋混合器上高速(1000 rpm)剧烈摇晃至少 15 分钟。在后续使用之前,必须将溶液平衡至室温并再次剧烈涡旋至少 10 分钟。

### 二. 细菌内毒素标准品和待测样品的制备和要求

根据该方法,每个孔需要 100  $\mu$ L 标准品。在无内毒素的玻璃管中,用细菌内毒素检测用水连续稀释 20 EU/mL 细菌内毒素标准品储备液,以制备标准品。按照经过验证的过程,试验所需器皿需经处理,以去除可能存在的外源性内毒素,耐热器皿建议用干热灭菌法(250 $^{\circ}$ C,至少 30 分钟)去除,也可采用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器具,如微孔板和微量加样器配套的吸头等,应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。所有的缓冲液也应保证无内毒素。

#### 注意:

- 一) 内毒素标准品工作液现用现配,使用后请丢弃,切勿反复使用。
- 二) 为了防止任何粘壁,我们建议每次稀释到下个梯度时更换枪头。
- 三) 为防止吸附,建议在无内毒素的玻璃管中制备内毒素标准品。 不建议使用塑料管。

#### 2.1 内毒素标准稀释程序如下:

- 2.1.1 如果 20 EU/mL 内毒素标准品储备液长时间放置,请记住在涡旋混合器上以 1000rpm 的速度混合储备液至少 10 分钟。
- 2.1.2 取 4 支一次性无内毒素玻璃管,并在管上标记内毒素标准工作溶液的浓度 (分别为 Std1:0.005EU/mL、Std2:0.05EU/mL、Std3:0.5EU/mL 和 Std4:5EU/mL)。
- 2.1.3 建立细菌内毒素检测标准曲线之浓度点 5 EU/mL (Std 4) 标准品,使用细菌内毒素

检测用水将 20 EU/mL 标准品储备液稀释四倍。取 250  $\mu$ L 20 EU/mL 内毒素标准品储备液,将其稀释到 750  $\mu$ L 水中,配制时需在涡旋混合器上以 1000 rpm 充分混合溶液至少 2 分钟。

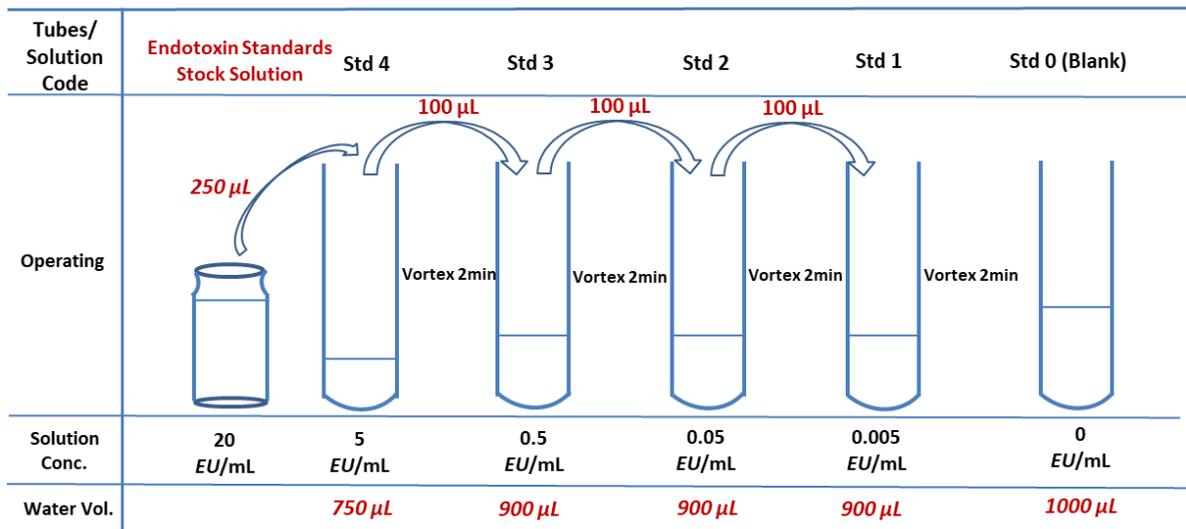
2.1.4 为了获得 0.5-0.005 EU/mL (Std 3-Std1) 的浓度点标准品,以 5EU/mL (Std 4) 进行 1:10 的连续稀释,如下所示 (以每种浓度的标准品 1 mL 为例):

2.1.5 将 900  $\mu$ L 用于细菌内毒素检测用水加入 Std 3 到 Std 1 的每个玻璃管中;

2.1.6 将 100  $\mu$ L 5 EU/mL 内毒素标准品 (Std 4) 加入 900  $\mu$ L 细菌内毒素检测用水(Std 3)中,在涡旋混合器 1000rpm 上充分混合至少 2 分钟,然后重复连续稀释制成内毒素标准溶液:Std 3、Std 2、Std 1,建立用于定量分析的 4 个内毒素浓度标准品;

2.1.7 Std 0(空白)仅含有细菌内毒素测试用水。

图二、标准曲线制备流程图



注意:

一) 每次样品检测都需要同时检测内毒素工作标准溶液并创建新的标准曲线。

### 三. 样品制备

#### 3.1 内毒素检测和样品处理过程的注意事项和要求

应小心处理测试样品,以避免微生物或内毒素污染。与样品或检测试剂直接接触的所有材料必须不含内毒素。样品稀释应在无内毒素的玻璃管中用细菌内毒素检测水进行。

如果样品没有及时检测,则必须将其储存在所有细菌活性受到抑制或内毒素水平不会随时间升高的条件下。为了抑制细菌活性,建议将样品在 2 - 8°C 的温度范围内储存,保存时间少于 24 小时。客户有责任确定容器和储存条件是否适合其特定样品。

#### 3.2 内毒素检测中样品干扰评估

为了确定是否存在干扰,应检查每个测试样品添加标准品后内毒素检测的回收率。如实验数据显示,加标后的样本检测值在减去未添加内毒素的样本检测值后,除以已知添加的内毒素含量,当添加的内毒素标准品的回收率在 50 - 200% 范围内时,视为此试验条件下样品溶液不存在干扰作用。

3.2.1 样本加标实验设计 : 加标回收实验为样品中加入一定浓度的线性范围内的内毒素标准品来进行。例如,在 1 份测试样品中加入 1 份 0.5 EU/mL 标准品,这将产生 0.25 EU/mL 的附加浓度值,任何来自样品本身的内源性内毒素在加标前也应进行测定,并通过该样品的 50%稀释进行校正,应从加标样品确定的值中减去,并计算内毒素的浓度以给出回收率。如果样品本身的内毒素浓度超过最高标准(5 EU/mL),则先将样品稀释至线性范围浓度,再加入标准品进行回收测试。根据公式计算 :

$$\text{Recovery(回收率)} = \frac{\text{CR}-\text{C}}{\text{加标之内毒素浓度}} \times 100\%。$$

范例请见下表,依照下表设计,则回收率的计算为  $((\text{CR1}-\text{C1})/0.25) \times 100\%$ , 或是  $((\text{CR2}-\text{C2})/0.25) \times 100\%$ , 若计算回收率落于 50 - 200% 范围内,则样本在该稀释倍数下视为不存在干扰作用。

样品 ID	稀释倍数	样品和标准体积	内毒素检测浓度 (EU/mL)
样品 1-1	2	150 μL 样品 1-1 + 150 μL 细菌内毒素检测水	C1
样品 1-2	16	150 μL 样品 1-2 + 150 μL 细菌内毒素检测水	C2
样品 1-1	2	150 μL 样品 1-1 + 150 μL Std 3 (0.5EU/mL)	CR1
样品 1-2	16	150 μL 样品 1-2 + 150 μL Std 3 (0.5EU/mL)	CR2

### 3.3 内毒素检测中样品干扰消除

样品中成分浓度高、干扰物质的存在或 pH 值不当都可能对内毒素检测造成干扰。对于高浓度组分,可以通过适当稀释来减轻对内毒素检测的干扰。不合适的 pH 值可以根据下述方法进行调节。如果干扰物质在稀释后仍继续造成干扰,则必须用无内毒素的缓冲液更换样品的缓冲系统,直到干扰消除。

3.3.1 若样本回率未在 50-200%间,样本可透过稀释减少或降低干扰程度,样品的稀释率应在最大有效稀释度 (MVD) 范围内。MVD 是计算内毒素限度的测试样品的最大允许稀释度之公式。MVD 公式计算如下：

$$MVD = \frac{\text{endotoxin limit} \times \text{concentration of Sample Solution}}{\lambda}$$

在公式中,请考虑以下示例:如果内毒素限值为 10 EU/mg, 样品浓度为 10 mg/mL,其中  $\lambda$  表示试剂盒标准曲线中采用的最低浓度,即 0.005 EU/mL。MVD(最大有效稀释度)计算=(10 EU/mg × 10 mg/mL) / 0.005 EU/mL,计算最大有效稀释倍数为 20,000 倍。进行计算时,应注意测试样品的单位及其浓度。使用的单位组合换算如下表所示：

浓度单位	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4
待测样本之内毒素含量放行浓度标准单位	EU/mg	EU/U	EU/dose	EU/mL
需采用待测样本之浓度单位	mg/mL	U/mL	dose/mL	ml/mL

3.3.2 鉴于用于内毒素测定的 rFC 内毒素检测试剂涉及酶促反应,因此可能需要将反应系统的 pH 值调整到 6.0 - 8.0 的范围内。如果反应系统的 pH 值偏离此范围,可以使用不含内毒素的盐酸、氢氧化钠或其他缓冲溶液进行调整。

**注意:**

一) 待测样品不可直接使用 pH 电极调节,以免样品被 pH 电极污染导致假阳性内毒素。建议将样品的一部分分开进行前实验,以选择合适的 pH 调节方法,实际测试样品应按方法使用无内毒素缓冲液进行调节。

### 3.4 样本制备

3.4.1 样本制备内毒素检测中不会造成干扰(加标回收率为 50-200%)的样品可以直接检测,无需稀释。

3.4.2 所有样品之内毒素浓度高于最高标准 (5EU/mL, Std 4) 时都必须用细菌内毒素检测水稀释,再进行细菌内毒素测试。

3.4.3 当样品本身添加的内毒素和内源性内毒素总量高于最高标准(5EU/mL, Std 4) 时,样品也需要稀释至标准曲线内可侦测之浓度。

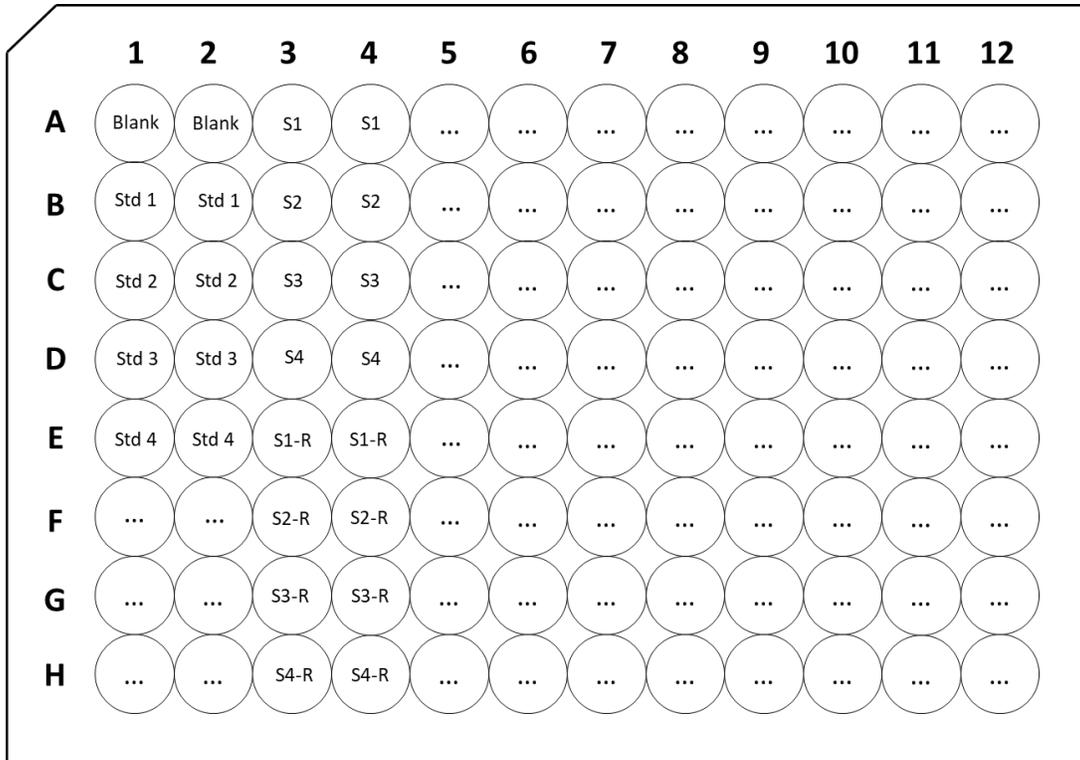
3.4.4 样品含有干扰成分,需要依照上述 3.2 及 3.3 章节所述以细菌内毒素检测水稀释样本减少干扰。

3.4.5 所有样品均应在无内毒素的玻璃管中稀释,在每个稀释步骤中,稀释液应在涡旋混合器上以 1000 rpm 的速度混合至少 2 min。

## 四. 将标准品和样品添加到板中

将 100  $\mu$ L 内毒素各浓度点标准品和样品添加到无内毒素的 96 孔板中。每种浓度的标准品和样品进行复孔加样。加入样品后,将孔板加上上盖置于之  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中 10 分钟。

图三、排板布局范例



注意:

一) 对于同一板,标准品和所有测试样品应以相同的荧光增益设置进行测量。

## 五. 准备底物工作溶液

重构试剂盒中的重组因子 C 蛋白 (RES056-C02) 和荧光底物干粉 (RES056-C03)按照下表中的说明复溶,使用试剂盒中提供的细菌内毒素检测水 (RES056-C04)加入到各冻干物质组份中, 配制储备溶液中。让冻干物质在室温下溶解 15 分钟,同时轻轻混合。必须避免剧烈摇晃或涡旋。

ID	组分名称	反应数	细菌内毒素检测用水加入体积
RES056-C02	Recombinant Factor C Protein	48 / 96	3mL / 6mL
RES056-C03	Fluorogenic Substrate	48 / 96	2.75mL / 5.5 mL

每孔需要 100  $\mu$ L 底物工作溶液。根据实验孔数计算底物工作溶液所需的总体积。将等体

积的重组 C 因子存储液(RES056-C02)和荧光底物存储液(RES056-C03)混合。例如,当实验孔的数量为 96 孔时,需要 9.6 mL 底物工作溶液,我们可以配制 10 mL 底物工作溶液以确保余量,将 5 mL 重组 C 因子存储液(RES056-C02)和 5 mL 荧光底物存储液(RES056-C03)混合至 10 mL 底物工作溶液。

**注意:**

- 一) 勿使用涡旋混合器混合重组 C 因子和荧光底物存储液。只需轻轻摇晃并混合即可。
- 二) 需要新鲜制备和使用重组 C 因子和荧光底物存储液的工作溶液。勿制备过量。

可参考下表配制底物工作溶液:

实验孔数	配制总体积	重组 C 因子存储液体积	荧光底物存储液体积
12 Tests	1.6 mL	0.8 mL	0.8 mL
24 Tests	2.8 mL	1.4 mL	1.4 mL
36 Tests	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
42 Tests	4.6 mL	2.3 mL	2.3 mL
48 Tests	5.2 mL	2.6 mL	2.6 mL
54 Tests	5.8 mL	2.9 mL	2.9 mL
60 Tests	6.4 mL	3.2 mL	3.2 mL
66 Tests	7.0 mL	3.5 mL	3.5 mL
72 Tests	7.6 mL	3.8 mL	3.8 mL
78 Tests	8.2 mL	4.1 mL	4.1 mL
84 Tests	8.8 mL	4.4 mL	4.4 mL
90 Tests	9.4 mL	4.7 mL	4.7 mL
96 Tests	10.0 mL	5.0 mL	5.0 mL

## 六. 添加底物工作溶液

取出 96 孔板,并通过八通道移液器将 100  $\mu$ L 底物混合物工作溶液分配到每个孔中。

## 七. 侦测零小时荧光读值

在水平振荡器上以 700 rpm/min 的速度涡旋孔板 20 秒,并立即测量零小时时间点的荧光值。激发/发射波长设置为 380/440 nm。

## 八. 孵化

用微孔板盖密封板,并在  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 小时。

## 九. 数据记录

在反应 1 小时读取荧光信号,激发/发射波长为 380/440 nm。

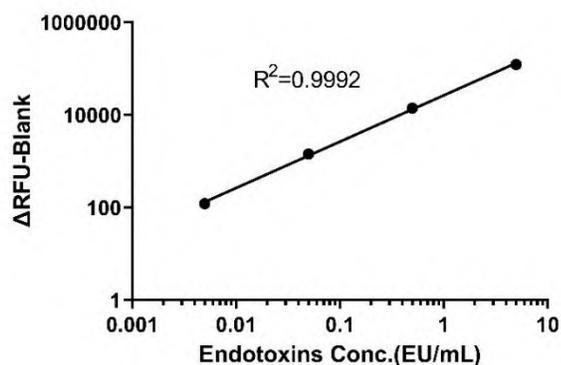
## 十. 数据分析

- 10.1 将荧光酶标仪读取的荧光值(零小时和一小时)导出到电子表格中。
- 10.2 从一小时的荧光中减去时间零的荧光,以获得所有孔的  $\Delta \text{RFU}$ 。计算每个标准品和样品的平均  $\Delta \text{RFU}$ 。
- 10.3 从每个标准品和样品的  $\Delta \text{RFU}$  中减去空白对照标准品的  $\Delta \text{RFU}$ 。
- 10.4 根据使用四种内毒素标准浓度 (5EU/mL、0.5EU/mL、0.05EU/mL、0.005EU/mL) 获得的结果分析线性。使用回归模型通过拟合线性模型  $\log(Y) = A\log(X) + B$  来计算标准曲线。标准浓度为 X,校准的  $\Delta \text{RFU}$  值为 Y。相关系数的绝对值  $|r|$ ,对于制备的标准内毒素溶液的范围,必须大于或等于 0.980。
- 10.5 使用标准曲线公式计算样品和加标样品的内毒素浓度,并计算回收率。通过考虑具有合格加标回收率的样品的稀释因子来计算未稀释样品的内毒素浓度。
- 10.6 如果待测样品的校准  $\Delta \text{RFU}$  高于最高标准 (5 EU/mL),则应用细菌内毒素用水稀释样品,并应重复测定。如果待测样品的校准  $\Delta \text{RFU}$  低于 0.005EU/mL,则应报告样品残留量  $<0.005\text{EU/mL}$ 。

## 典型数据

### 一、标准曲线：

对于每个实验,需要为每个微孔板设置一条标准曲线, RFU 值可能会因不同的实验室、测试仪或设备而异。不同的酶标仪和不同的增益值可能会产生不同的荧光信号。请根据设备手册调整参数。当信号过高时,降低增益值。以下数据来自 BMG CLARIOstar Plus。以下数据仅供参考。



标准品	浓度 (EU/mL)	ΔRFU	ΔRFU-空白
Std 4	5	124229	123698
Std 3	0.5	14582	14051
Std 2	0.05	1974	1442
Std 1	0.005	655	123
Std 0	0	532	0

### 二、灵敏度

检测线性范围 (EU/mL)	定量下限 (LoQ*)
0.005-5 EU/mL	0.005EU/mL

### 三、批内精密度和准确度

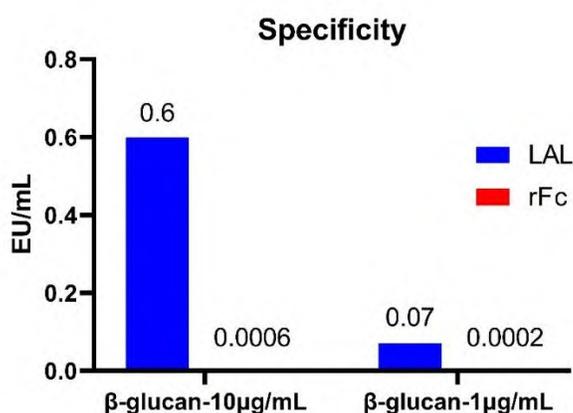
样品浓度 (EU/mL)	5	3.75	0.2	0.01	0.005
复孔数量	10	10	10	10	10
平均值 (EU/mL)	4.205	3.562	0.239	0.010	0.005
标准差	0.037	0.080	0.011	0.001	0.001
变异系数 (%)	0.9%	2.2%	4.5%	11.2%	18.2%
回收率	84.1%	95.0%	119.6%	101.1%	94.9%

#### 四、批间精密度和准确度

样品浓度 (EU/mL)	5	3.75	0.2	0.01	0.005
批次数量	10	10	10	10	10
平均值 (EU/mL)	4.338	3.712	0.239	0.009	0.005
标准差	0.168	0.148	0.028	0.001	0.001
变异系数 (%)	3.9%	4.0%	11.5%	14.9%	16.3%
回收率	86.8%	99.0%	119.6%	89.9%	90.3%

#### 五、专属性

与 LAL 检测不同,由于 rFc 检测试剂盒中不存在 G 因子,因此不会因  $\beta$ -葡聚糖活化而出现假阳性结果。在 LAL 检测和 rFc 检测中检测 10  $\mu$ g/mL 及 1  $\mu$ g/mL  $\beta$ -葡聚糖。在 LAL 测定中,检测到值为 0.6 EU/mL 和 0.07 EU/mL 的非特异性信号。在重组因子 C 方法中未检测到非特异性信号。



#### 六、适用性

该试剂盒适用于重组人干扰素  $\alpha$ -1b 和人胰岛素注射液等注射药物的内毒素检测。

样本	内毒素限值	MVD	稀释因子	内毒素检测值	回收率
重组人干扰素 $\alpha$ -1b	10EU/mL	2000	32	<0.16EU/mL	102%
人胰岛素注射	32EU/mL	6400	4	<0.02EU/mL	97%

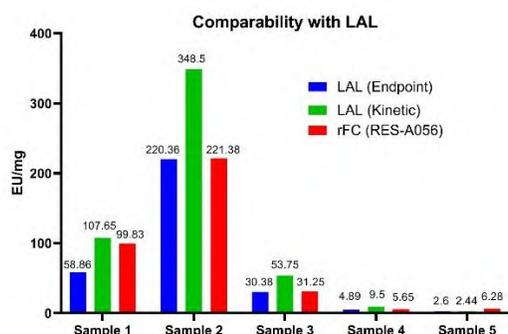
## 七、干扰物质

试剂具有出色的缓冲液兼容性。对于特定缓冲液,建议您验证回收率以确定最小稀释率。

反应基质	回收率	稀释倍数
1M NaCl	140%	16
20mM CaCl <sub>2</sub>	82%	8
20mM MgCl <sub>2</sub>	98%	4
1M Sodium acetate, pH5.0	73%	16
50mM Sodium acetate, pH3.5	74%	20
100mM Tris, pH10.9	113%	80
100mM Glycine, pH3.5	109%	16
1×PBS, pH7.5	102%	40
1×PBS, pH6.0	91%	20
50 mM Tris,100 mM Glycine,225 mM Arginine,150 mM NaCl,0.005% Tween 80, pH7.5 with 11% Trehalose	81%	4
50 mM Tris,100 mM Glycine,25 mM Arginine,150 mM NaCl, pH7.5 with 0.01% Tween80 with 11%Trehalose	88%	16
Essential 8™ Flex Basal Medium (Thermofisher, Cat.No. A2858501)	74%	4
mTeSR™ Plus (Stemcell, Cat.No. 100-0276)	82%	32
CelThera™ GMP T Cell Expansion Medium (Acrobiosystems, Cat.No. GMP-CM3101)	93%	4
RPMI 1640 Medium (Hyclone, Cat.No. SH30809.01)	109%	8
DMEM Medium (Basalmedia, Cat.No. L120KJ)	104%	8
CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, no phenol red, bottle format(Gibco, Cat.No. A3705001)	91%	16
12.5 mM Histidine Buffer,pH6.5	88%	4
Keytruda Formulation (1.55 mg/mL L-histidine, 0.2mg/mL polysorbate 80, 70mg/mL sucrose in water, pH5.2-5.8)	76%	64
Hemlibra Formulation (26.1 mg/mL L-arginine, 3.1 mg/mL L-histidine, 0.5mg/mL poloxamer 188, adjusted to pH 6.0 with L-asparticacid)	100%	4
30%DMSO	99%	16
HAS (25mg/mL)	73%	64
Toripalimab (40mg/mL)	83%	40
Multiple Electrolytes Injection (Baxter)	96%	4
100%FBS	109%	10

## 八、LAL 的可比性

采用不同方法检测 5 个样品中的内毒素残留,rFC 法与 LAL 法检测结果偏差在 2 倍以内。



## 常见问题与解答

常见问题	可能造成的原因	解决方案
标曲线性差	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 移液不准确</li> <li>* 稀释不准确</li> <li>* 荧光读数仪参数不合适</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 检查移液器的准确度,确保移液器准确后重复实验。</li> <li>* 重复实验。</li> <li>* 检查 5EU/mL 对应的荧光信号是否超出仪器的检测范围,调整合适的仪器参数后再读数。</li> </ul>
复孔间 CV 大	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 移液不准确</li> <li>* 耗材污染</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 检查移液器的准确度,确保移液器准确后重复实验。</li> <li>* 确保使用的所有耗材无热原,重复实验。</li> </ul>
背景值高	* 内毒素污染工作溶液 (如重组 C 因子或荧光底物)	* 使用新开封的试剂盒进行检测,保证实验使用的所有耗材和试剂均无菌无热原。
检测信号值很低	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 激发光和发射光设置错误</li> <li>* 增益值太低</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 检查仪器设置参数。</li> <li>* 提高增益值重新测定。</li> </ul>
样本检测值信号太高,但是标曲检测正常	* 检测样本中内毒素含量太高,超出标曲范围以外	* 将样本稀释到线性范围内重新检测。
样本检测值信号太低,但是标曲检测正常	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 样本有基质干扰</li> <li>* 样本 pH 过高或过低</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 在 MVD 内尽可能增大样本稀释倍数来减少基质干扰。</li> <li>* 使用无内毒素盐酸或氢氧化钠将样本 pH 调整至 6-8 范围。</li> </ul>