

M5 HiPer Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit

内毒素定量检测试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	16T	MF843-01

【储存条件】 常温保存

【产品简介】

本试剂盒设计为一种定量分析方法，可简单灵敏地检测样品中是否存在 LPS。它使用比色法，其中内毒素催化 LAL 中酶原的活化，后者将裂解无色底物以产生有色终产物。最终产品可以通过分光光度法测量并与标准曲线进行比较。本内毒素检测系统是一种体外终点内毒素检测系统，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。可测量的内毒素浓度范围为 0.01 至 1 EU/ml。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。仅科研使用。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。

【产品特点】

- 良好的线性和重现性
- 高灵敏度和广泛的应用范围
- 即用型试剂和材料



【其他需准备物料】

1. 浓盐酸
2. 氢氧化钠, 0.1 M, 溶解在 LAL 试剂水中。该试剂用于必要时调节样品 pH 值
3. 盐酸, 0.1 M, 在 LAL 试剂水中稀释。该试剂用于必要时调节样品 pH 值
4. 水浴, 设置在 37° C ± 1.0° C
5. 带有 545 nm 滤光片的光谱仪或滤光片光度计
6. 涡流混合器
7. 计时器

【产品组分】

LAL Reagent Water 50 ml	2 瓶
E. coli Endotoxin Standard	1 管
Chromogenic Substrate	1 管
Color-stabilizer #1	1 管
Color-stabilizer #2	1 管
Color-stabilizer #3	1 管
Endotoxin-free Vials	5 × 5 管
Endotoxin-free Tips 200 µl	1 盒(96 tips)
Endotoxin-free Tips 1000 µl	2 袋 (12 tips)
Incubation Rack	1 个

【操作流程】

一、样本制备

用于标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。始终使用无菌技术。待测样品必须以阻止所有细菌活动的方式储存。例如，样品使用前 24 小时内可以储存在 2-8° C，但长期使用需冷冻

pH

使用 LAL 试剂水溶解或稀释试样。由于 LAL-内毒素反应依赖于 pH，样品的 pH 值应在 pH 6-8 (18-26° C) 以确保良好的线性。因此，如有必要，我们建议使用氢氧化钠 (0.1 N，溶解在 LAL 试剂水中) 或盐酸 (0.1 N，在 LAL 试剂水中稀释) 调节 pH 值。

二、试剂制备

1、鲎变形细胞裂解液 (LAL)

加入 1.7 ml LAL 试剂水，复溶冻干裂解液。轻轻摇动放置 30 秒，避免起泡。如果复溶后在 -20° C 无菌条件下储存，可以保持稳定 1 周，不建议储存更长时间。必须在 10 分钟内用完或存放。避免反复冻融。

2、显色底物 (Chromogenic Substrate)

加入 1.7 ml 的 LAL 试剂水来复溶底物。复溶后底物溶液在 2-8° C 下可保持稳定 1 个月。避免将显色底物溶液长时间直接暴露在光线下。

3、终止液

首先，将 2 ml 浓盐酸加入 50 ml LAL 试剂水中并充分混合，使终浓度为 0.46 M HCl。然后，用 10 ml 0.46 M HCl 复溶偶氮试剂 #1 即得到终止液。配制好的终止液在 2-8° C 下可稳定保存 1 周。注意：此步骤应在通风橱中进行，因为有盐酸具有强挥发性。

4、偶氮试剂 #2 和 #3

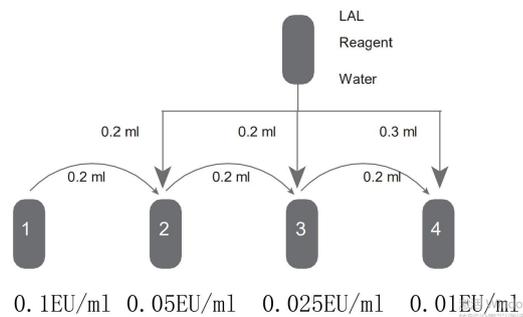
分别用 10 ml LAL 水复溶偶氮试剂 #2、3。复溶后试液可以在 2-8° C 下保持稳定 1 周。

5、内毒素标准品溶液

冻干内毒素标准品的效价已在试剂瓶的标签上注明。建议使用适当体积的 LAL 试剂水来重新配制内毒素标准品。例如，通过加入 2 ml LAL 试剂水溶解 20 EU 的冻干内毒素标准品。通过涡旋彻底混合 15 分钟以获得 10 EU/ml 的内毒素储备溶液。配制好的内毒素原液在 2-8° C 下可稳定保存 1 周。不要冷冻内毒素标准品母液。

6、准备 1EU/ml 内毒素溶液

以准备标准浓度系列溶液在每次检测中，至少应有四个内覆盖浓度浓度范围的内毒素标准溶液以生成标准曲线。即如果样品的内毒素浓度在 0.01-01 EU/ml 范围，则系列内毒素标准溶液溶液可以分别为 0.1、0.05、0.025 和 0.01 EU/ml。下图概述了制备系列内毒素标准溶液的示例。一次溶液都应通过涡旋混合混合 30 秒。



三、测试步骤

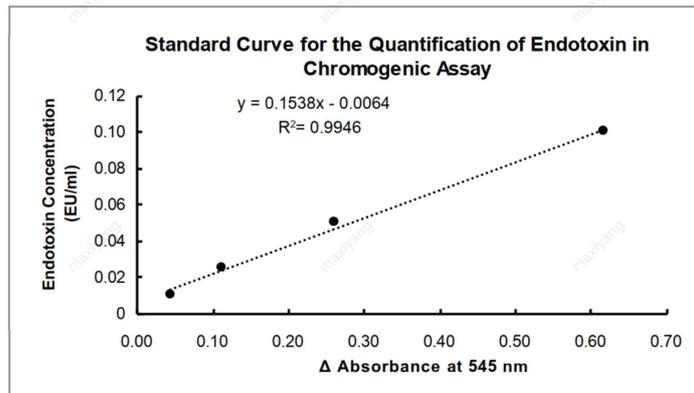
1. 小心地将 100 μ l 标准品、样品和 LAL 试剂水分别加入到不同的无内毒素试管中，并将它们标记为标准品 1、2、3、4、样品 1、2 等和空白。样品也应使用涡旋混合器彻底混合 30 秒。避免起泡。

- 再向每个试管中加入 100 μ l 复溶后的 LAL。并轻轻混合均匀。
- 如果内毒素浓度范围为 0.01-0.1 EU/ml, 则使用水浴在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下将所有样品瓶与架子一起孵育 T1。如果内毒素浓度在 0.1-1 EU/ml, 使用在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 T2。**注意: 最佳值, T1 (20 分钟) 和 T2 (9 分钟)。**
- 孵育结束后, 迅速向每个试管中加入 100 μ l 显色底物溶液并轻轻混合。请勿摇晃或倒置涡旋以避免起泡, 然后迅速在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中继续孵育 6 分钟。
- 向每个试管中加入 500 μ l 重新配制的终止液(偶氮试剂 #1) 并轻轻旋转以充分混合。不要摇晃或颠倒涡旋以避免起泡。然后加入 500 μ l 偶氮试剂#2 加入每个试管并混合均匀。最后加 500 μ l 偶氮试剂 #3 到每个试管中。轻轻旋转每个试管以充分混合 3 秒钟。避免起泡。
- 读取试管中液体在 545 nm 处的吸光度。使用蒸馏水作为空白将光度计调零。**注意: 结果也可以通过 Microplate Reader 读取, 将 200 μ l 最终溶液转移到 96 孔板中以读取 545 nm 处的吸光度。反应过程中所有试剂用量均不可调整。**

四、浓度计算

在标准条件下, 545 nm 处的吸光度在 0.01-0.1 EU/ml 和 0.1-1 EU/ml 范围内与浓度呈线性关系。在 x 轴上绘制四个标准品的吸光度, y 轴对应的内毒素浓度 (以 EU/ml 为单位), 在这些点之间画一条最合适的直线, 并以此曲线公式计算样品的内毒素浓度。示例使用的数据如下:

Tube No.	Sample	Absorbance at 545nm Δ	Absorbance
1	LAL reagent water (Blank)	0.0525	-
2	0.01 EU/ml Standard	0.0965	0.0441
3	0.025 EU/ml Standard	0.1650	0.1125
4	0.05 EU/ml Standard	0.3139	0.2614
5	0.1 EU/ml Standard	0.6702	0.6177



如果样品的平均吸光度为 x, 则样品的内毒素浓度将为 $0.1538x + 0.0064$ EU/ml。上图仅为示例曲线, 标准品的 OD 值可能因化验不同而有所差异。**注意: 标准品的稀释度和孵育温度是影响吸收值的关键因素, 确保内毒素标准品完全溶解很重要, 孵育温度应严格保持在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。**

五、性能特征线性

必须验证用于测量内毒素值的浓度范围内标准曲线的线性。应至少检测 4 种覆盖预期浓度范围的内毒素标准品和空白样品, 一式两份。标准品的个体平均吸光度与其相应内毒素浓度的相关系数 (r) 的绝对值应 ≥ 0.980 。

重现性

应使用重复样本以建立良好的技术和低变异系数。变异系数 (C.V.) 等于一组值的标准偏差除以平均值的 100 倍, 并以百分比表示。简历吸光度应小于 10%。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。