

内毒素、热源检测用 试剂·系统

综合目录

CONTENTS

内毒素检测基础知识	3
鲎试剂选择指南	5

内毒素检测用试剂

内毒素特异性检测的原理	6
PYROSTAR™ ES-F系列	6
PYROSTAR™ ES-F/Plate	8
Limulus Color KY系列	9
PYROSTAR™ Neo+	10
Limulus ES- II 系列	12
Limulus ES- II Plus CS Single Test <i>Wako</i>	13

相关试剂

内毒素标准品	14
内毒素检测用提取液	15
LAL试剂用水	16
ES-Buffer内毒素特异性缓冲溶液	16
内毒素指示试剂LPS	16

热原检测试剂

LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit	17
SLP-HS Single Reagent Set II	19

内毒素检测用仪器

Toxinometer ET-7000	20
Toximaster FQC1、Toximaster FQC1 Lite软件	21

相关器材

内毒素检测相关耗材	23
-----------	----

内毒素检测的基础知识

1. 内毒素的概念

内毒素的生物活性和耐热性

内毒素是组成革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖,也被称为Lipopolysaccharide或LPS。它是一种典型的热源,微量(ng 级, 10^{-9}g)进入血液中也会引发发热等生物反应。内毒素还具有高耐热性,高温灭菌也无法使其完全失活,需要在 250°C 以上进行30 min的干热灭菌才能使其完全失活。革兰氏阴性菌无处不在,即使细菌死亡,内毒素依然会残留。内毒素与巨噬细胞和树突状细胞的TLR4 (Toll样受体4)结合,并通过NF- κ B作用于细胞核产生各种细胞因子。不同的细胞因子,会呈现出不同的生物活性。

内毒素的结构

内毒素的结构图如图1所示,脂质A部分负责生物活性的主体,分子量约2,000。包括糖链部分在内的总分子量通常约为5,000~8,000。内毒素具有亲水性部分(糖链)和疏水性部分(脂质A),因此在水溶液中聚集时,会形成表现分子量为数十万到数百万的胶束结构。据报道,胶束结构发生变化时也会影响生物活性。

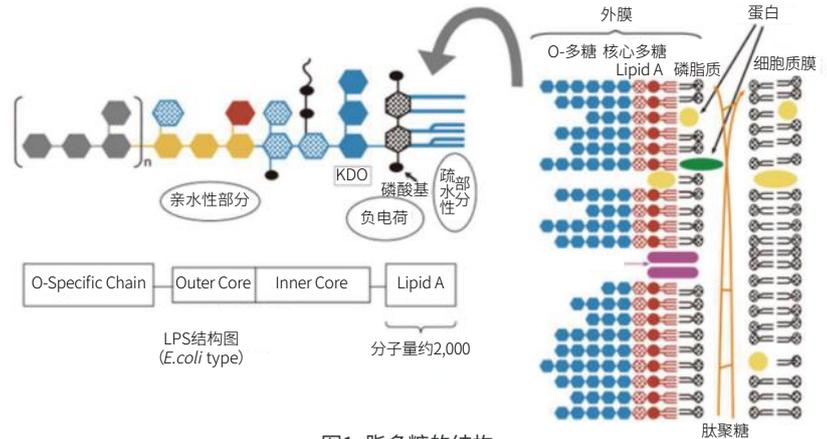


图1: 脂多糖的结构

※ 来源:高岡文(2011) 抗菌防微,39,47-56

2. 关于内毒素检测

内毒素会扩增并激活鲎试剂中的因子,通过检测鲎试剂级联反应引发的凝胶化、浊度增加及合成底物裂解引起的显色反应,可以确认内毒素含量。

反应机制

内毒素测试使用鲎血提取物制备的鲎试剂。

样品中含内毒素时,丝氨酸蛋白酶前体的C因子、B因子和凝固酶原将通过级联反应依次被激活(图2),最终凝固蛋白原被水解成凝固素,形成不溶性凝胶。通过检测级联反应引发的三种特征性指标——凝胶形成、浊度变化,以及合成显色底物裂解产生的黄色显色产物,即可实现对样品内毒素含量的分析。

鲎试剂(内毒素非特异性试剂)还存在由G因子介导的反应通路,除内毒素外,还会与真菌细胞壁的组成成分(1→3)- β -D-葡聚糖(β -葡聚糖)发生反应。虽然天然的鲎试剂具有非特异性特征,但是通过去除G因子或阻断G因子的反应,即可制备特异性内毒素裂解液试剂。

内毒素检测时,需综合考虑所需检测精度、测试频率、样品数量等因素,选择合适的试剂。

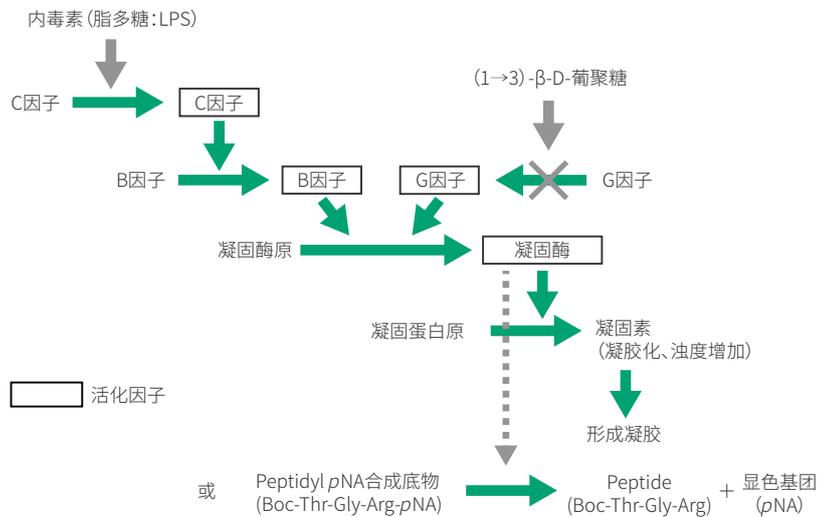


图2. 鲎试剂的反应机制

检测方法

动态浊度法

动态浊度法通过凝胶化伴随的浊度变化来检测内毒素导致的鲎试剂的活化。凝胶化时间 (Tg) 在内毒素检测仪Toxinometer中, 是指反应起始点至透射光强度比值超过预设阈值所需的时间; 而在酶标仪中, 则是反应起始至吸光度值 (OD值) 超过预设阈值所需的时间。根据凝胶化时间 (Tg) 与内毒素浓度 (C) 之间的关系绘制标准曲线, 可定量样品中的内毒素浓度。

● 相关试剂

ES-F系列	6
ES-F/Plate	8
ES-II系列	12

动态显色法

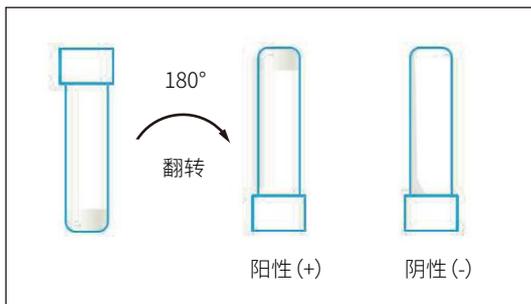
动态显色法通过裂解释放合成底物引起的吸光度变化, 来检测内毒素引发的鲎试剂活化。FUJIFILM Wako的动态显色法鲎试剂试剂采用特异性显色底物——对硝基苯胺 (p-nitroaniline, pNA) 的偶联合成肽段, 其裂解释放的对硝基苯胺在405 nm波长处有特异性吸收。将反应起始至吸光度值 (OD值) 达到预设阈值所需的时间定义为激活时间 (Ta)。根据激活时间与内毒素浓度之间的关系绘制的标准曲线, 可定量分析样品中的内毒素浓度。

● 相关试剂

Color KY系列	9
------------	---

凝胶法

将试管内的鲎试剂与样品混合, 使用干浴器在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下加热 60 ± 2 min, 期间不要振动。加热后立即缓慢地将试管翻转 180° , 如果形成不变形或不崩塌的凝胶则判定为阳性, 而未形成上述凝胶则判定为阴性。通过将样品梯度稀释, 确定在几倍稀释下可呈阳性。判定为阳性的最大稀释倍数 (或最小浓度) 称为终点。



● 相关试剂

ES-F系列	6
ES-II系列	12

重组级联试剂 (rCR)

重组级联试剂包含三种重组蛋白 (鲎C因子、B因子和凝固酶原) 和合成显色底物t-Boc-Thr-Gly-Arg-pNA。待测样品中存在内毒素时, 会活化C因子并引起级联反应, 随后裂解释放合成底物释放对硝基苯胺 (pNA)。将反应起始至吸光度值 (OD值) 达到预设阈值所需的时间定义为激活时间 (Ta)。根据激活时间与内毒素浓度之间的关系绘制的标准曲线, 可定量分析样品中的内毒素浓度。

● 相关试剂

PYROSTAR™ Neo+	10
----------------	----

样品的影响

进行内毒素测试时, 需要注意样品对测试的影响 (反应干扰因子)。

● 影响鲎试剂的因素

- ① 导致蛋白变性的因素 (酸、碱、尿素、表面活性剂、有机溶剂)
- ② 蛋白酶、蛋白酶抑制剂
- ③ 螯合剂 (可螯合反应所需的钙离子和镁离子)
- ④ 色素 (405 nm处明显吸收的物质)
- ⑤ 浊度

● 影响内毒素的因素

- ① 金属离子 (Fe、Al、Ga、Cr等离子, 即使只有 μM 级也会产生影响)
- ② 表面活性剂

通过对待测样品添加已知浓度的内毒素标准品, 计算回收率来判断样品的干扰效应, 该方法在各国药典中被称为**干扰试验**。动态显色法/动态浊度法 (光学定量法) 中, 添加内毒素的回收率在50~200%时, 样品对检测没有干扰, 可认为样品在此浓度下不影响内毒素检测。若存在干扰, 可稀释样品后再检测以降低干扰影响, 但需注意稀释样品会在最大有效稀释倍数的范围内进行稀释。最大有效稀释倍数 (MVD) 取决于需检测的内毒素浓度和所用鲎试剂的检测灵敏度 (干扰试验和最大有效稀释倍数的详细信息请参考各国药典的内毒素检测法)。

适用领域

- 注射制剂
- 再生医疗产品
- 透析制剂
- 医疗器械
- 生物药

参考资料

● 内毒素测试的实施方法

- ① 日本药典
(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>)

● 内毒素的一般结构和作用机制

- ② 棚元惠『エンドトキシンと医薬品の品質管理』
Bull. Natl. Inst. Health Sci., 126, 19-33 (2008)
(<http://www.nihs.go.jp/library/eikenhoukoku/2008/019-033.pdf>)
- ③ レギュラトリーサイエンス財団HP
(<https://www.pmrj-rs.jp/>)

Toxinometer法

检测方法	相关标准	试剂种类	相关产品	页码
动态浊度法	各国药典	Single test	Limulus ES-II Single Test <i>Wako</i>	P12
		Multi test	Limulus ES-II Test <i>Wako</i>	P12
	FDA认证、各国药典	Single test	PYROSTAR™ ES-F SINGLE TEST	P6
		Multi test	PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST	P6
动态显色法	各国药典	Single test	Limulus Color KY Single Test <i>Wako</i>	P9
		Multi test	Limulus Color KY Test <i>Wako</i>	P9
重组级联试剂 (rCR)	美国药典	Multi test	PYROSTAR™ Neo+	P10

酶标仪法

检测方法	相关标准	试剂种类	相关产品	页码
动态浊度法	FDA认证、各国药典	Multi test	PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST	P6
动态显色法	各国药典	Multi test	Limulus Color KY Test <i>Wako</i>	P9
重组级联试剂 (rCR)	美国药典	Multi test	PYROSTAR™ Neo+	P10

凝胶法

检测方法	相关标准	试剂种类	相关产品	页码
凝胶法	各国药典	Single test	Limulus ES-II Single Test <i>Wako</i>	P12
		Multi test	Limulus ES-II Test <i>Wako</i>	P12
	FDA认证、各国药典	Single test	PYROSTAR™ ES-F SINGLE TEST	P6
		Multi test	PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST	P6

Single test

独立分装试剂, 预先在反应试管中分装单次检测用的鲎试剂。

Multi test

使用内毒素测试用水溶解鲎试剂, 可按需分装至反应试管或孔板。

内毒素检测用试剂

内毒素特异性检测的原理

鲎试剂和内毒素的级联反应机制如图1所示。反应体系中存在(1→3)-β-D-葡聚糖(β-葡聚糖)*时,会激活G因子,引起伴有凝胶化的假阳性反应。这种情况意味着无法对内毒素进行特异性检测。因此FUJIFILM Wako开发了Limulus ES,该产品通过在反应体系中加入过量的β-葡聚糖使其共存来抑制β-葡聚糖对鲎试剂的活化,从而实现特异性检测内毒素。

如图2所示,β-葡聚糖和鲎试剂的反应范围位于较窄的浓度范围,因此过量的β-葡聚糖可以抑制自身反应。但是内毒素和鲎试剂会在低浓度至高浓度的宽范围内发生反应,并且存在过量的β-葡聚糖也不会抑制反应,因此内毒素特异性试剂Limulus ES即使在含有β-葡聚糖的情况下,也能正常反应(图3)。

* (1→3)-β-D-葡聚糖主要来源为霉菌(真菌)或经纤维素滤膜过滤所得。

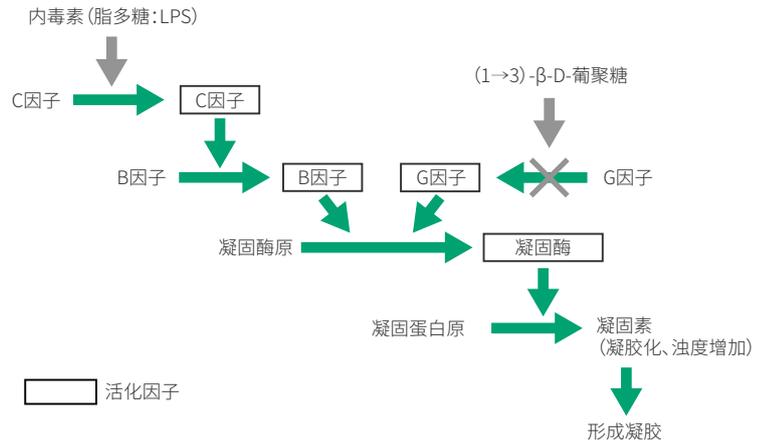


图1. 鲎试剂的反应级联机制

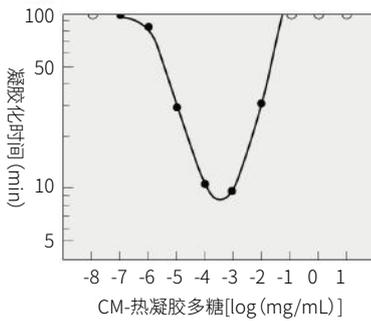


图2. CM-热凝胶多糖和鲎试剂的反应

将Toxinometer的检测时间设定为99 min,并使用Limulus HS进行检测。
○ 99 min内无凝胶生成
● 有凝胶生成

* Limulus HS是指内毒素非特异性反应鲎试剂, Limulus ES是指内毒素特异性反应鲎试剂。

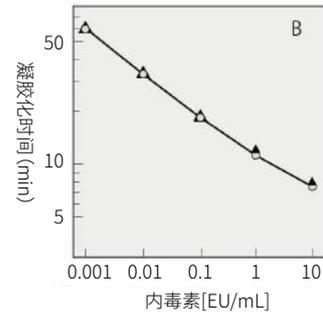
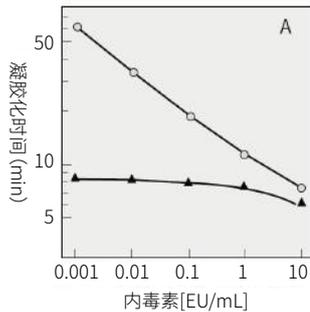


图3. CM-热凝胶多糖对使用Limulus HS和Limulus ES进行内毒素检测的影响

A: 使用Limulus HS B: 使用Limulus ES
使用Toxinometer检测99 min
○ 内毒素稀释系列
▲ 含有1 μg/mL CM-热凝胶多糖的内毒素稀释系列

PYROSTAR™ ES-F系列

特点

- 取得美国食品药品监督管理局(FDA)认可
- 符合药典规定的动态浊度法和凝胶法
- 不受样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的影响,可特异性检测内毒素
- 灵敏度为0.015的试剂可支持低至0.001 EU/mL的定量分析(动态浊度法)
- Single Test是预先分装至反应试管的单次检测用鲎试剂,操作简便、可防止污染
- 长时间检测时,阴性对照(NC)也不会发生反应,可实现稳定的检测

Single Test



Multi Test



Single Test

Toxinometer法

动态浊度法

凝胶法

内毒素特异性

FDA

各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
295-72301	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F SINGLE TEST SENSITIVITY 0.015 EU/mL	0.015	○	25 Tests
292-81601	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F SINGLE TEST 0.03	0.03	○	25 Tests

Multi Test

Toxinometer法

动态浊度法

凝胶法

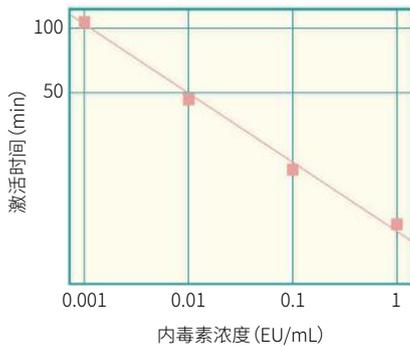
内毒素特异性

FDA

各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
291-75701	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST (without CSE)	0.015		100 Tests (2 mL瓶×5瓶)
298-35891	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.03	0.03		50 Tests (5.2 mL用×1瓶)
294-81301	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.03 with CSE	0.03	○	50 Tests (5.2 mL用×1瓶)
295-35921	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.25	0.25		50 Tests (5.2 mL用×1瓶)

标准曲线信息



回归方程: $\log(Tg) = -0.289200 \log(C) + 1.13012$

相关系数: -0.9984

内毒素浓度 (EU/mL)	激活时间 (min)
0.001000	103.8
	103.8
	103.6
0.010000	49.2
	49.0
	48.8
0.100000	25.2
	25.2
	25.2
1.000000	14.0
	14.0
	14.2

动态浊度法中添加内毒素的回收率

Single Test

待测样品	回收率 (%)
NaCl (0.9%)	74%
NaCl (3%)	39%
葡萄糖 (2.5%)	80%
林格氏液 (原液)	87%
硫酸镁 (50 mM)	72%
碘肽葡胺 (1.0%)	69%
碳酸氢钠 (0.25%)	89%
柠檬酸钠 (0.05%)	108%
肝素钠 (10 U/mL)	97%
木糖醇 (2.5%)	82%
内毒素提取液 (0.1%)	77%
盐酸吡哆醇 (0.25 mg/mL)	104%
抗坏血酸钠 (10 mg/mL)	102%
盐酸头孢唑兰 (2.5 mg/mL)	83%

Multi Test

待测样品	回收率 (%)
NaCl (0.9%)	105%
NaCl (3%)	88%
葡萄糖 (2.5%)	98%
林格氏液 (原液)	103%
硫酸镁 (50 mM)	100%
碘肽葡胺 (1.0%)	89%
碳酸氢钠 (0.25%)	126%
柠檬酸钠 (0.05%)	93%
肝素钠 (10 U/mL)	92%
木糖醇 (2.5%)	91%
内毒素提取液 (0.1%)	90%
盐酸吡哆醇 (0.25 mg/mL)	100%
抗坏血酸钠 (10 mg/mL)	74%
盐酸头孢唑兰 (2.5 mg/mL)	85%

特点

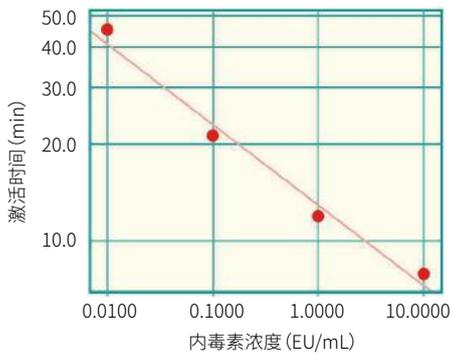
- 特异性检测内毒素, 不受样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的影响
- 美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证
- 每孔仅需50 μL样品即可进行测量
- 受检测样品pH的影响较小, 可稳定进行内毒素检测



Multi Test 酶标仪法 动态浊度法 凝胶法 内毒素特异性 FDA 符合药典要求

产品编号	产品名称	检测范围 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
543-10331	PYROSTAR™ ES-F/PLATE TEST 2 mL×4 vials	0.01-10	○	160 tests (2 mL×4 vials)
540-10341	PYROSTAR™ ES-F/PLATE TEST 5.2 mL×4 vials	0.01-10	○	400 tests (5.2 mL×4 vials)
548-10401	PYROSTAR™ ES-F/PLATE TEST 2 mL×100 vials	0.01-10		4000 tests (2 mL×100 vials)

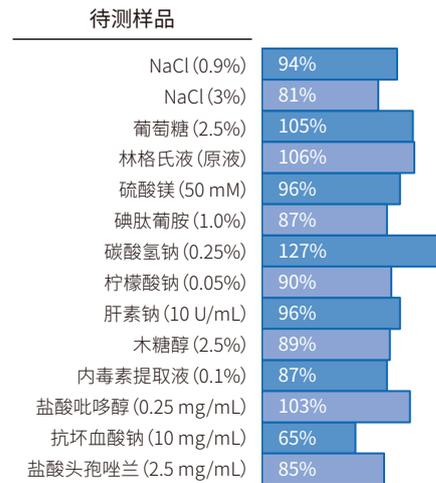
标准曲线信息



回归方程: $\log(Tg) = -0.260424\log(C) + 1.10351$
 相关系数: -0.9943

内毒素浓度 (EU/mL)	激活时间 (min)
0.0100	46.0
	46.7
	43.3
0.1000	21.2
	21.5
	21.2
1.000	12.0
	12.1
	11.9
10.000	7.4
	7.4
	7.5

动态浊度法中添加内毒素的回收率



Limulus Color KY系列

特点

- 不受样品中(1→3)-β-D-葡聚糖影响,可特异性检测内毒素
- 检测范围广,高浓度或低浓度的样品均可使用
- 灵敏度高(酶标仪法低至0.0005 EU/mL),通过稀释样品,降低样品中抑制剂和激活剂的干扰
- 长时间检测时,阴性对照(NC)也不会发生反应,可实现稳定的测试



Single Test Toxinometer法 动态显色法 内毒素特异性 各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
291-53601	Limulus Color KY Single Test Wako	0.0002-5	○	25 Tests

Multi Test Toxinometer法 酶标仪法 动态显色法 内毒素特异性 各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
291-53101	Limulus Color KY Test Wako	0.0005-5	○	60/120 Tests** (2 mL用×3瓶)

※ 酶标仪法检测时可使用120 Tests (50 μL/孔)。

原理

Limulus Color KY的显色原理是裂解液中的丝氨酸蛋白酶前体依次被激活,最后凝固酶水解显色合成底物,并释放出显色基团(pNA),呈现出黄色。

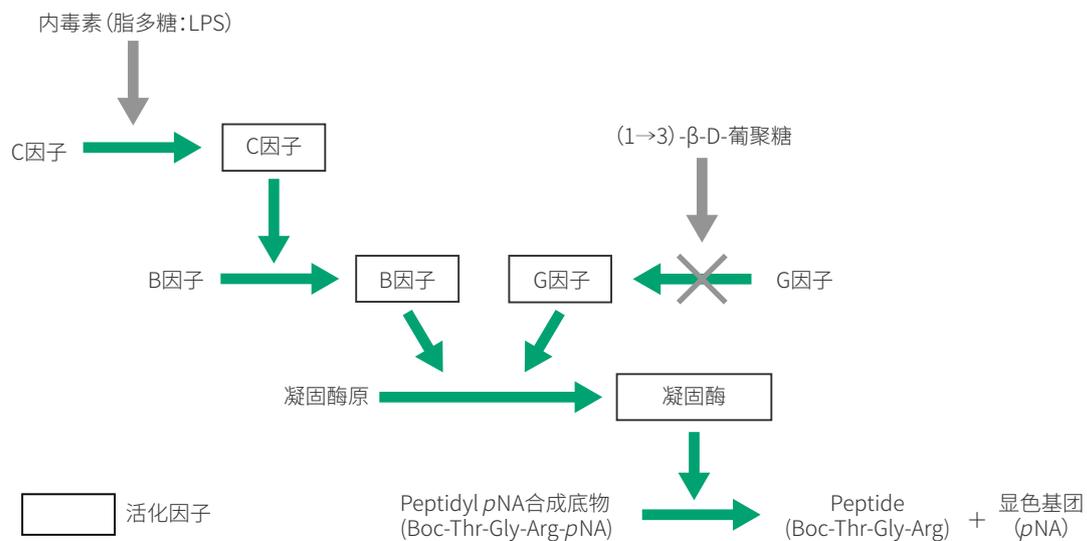
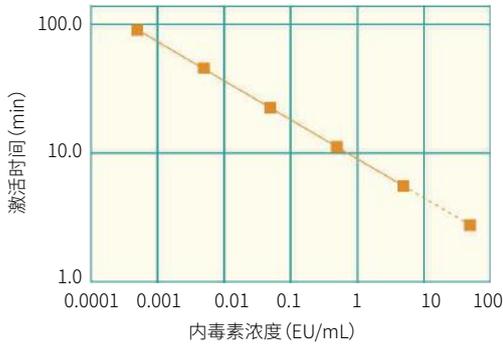


图1. Limulus Color KY试剂的显色级联机制

标准曲线(酶标仪使用示例)

Limulus Color KY Test Wako的检测条件



样品量:50 μ L
检测波长:405 nm-650 nm
测光间隔:40 s
检测时间:200 min
Onset OD:0.015

内毒素浓度 (EU/mL)	激活时间 (min)
0.0005	100.7
	86.7
	94.0
0.0050	44.7
	44.7
	44.3
0.0500	21.0
	22.0
	22.3
0.5000	10.3
	10.7
	11.1
5.000	5.0
	5.2
	5.3

显色法中添加内毒素的回收率

使用Limulus Color KY Test Wako检测时

待测样品	回收率
NaCl (0.9%)	83%
NaCl (3%)	100%
葡萄糖 (2.5%)	90%
林格氏液 (原液)	104%
硫酸镁 (50 mM)	79%
碘肽葡胺 (1.0%)	85%
碳酸氢钠 (0.25%)	96%
柠檬酸钠 (0.05%)	110%
肝素钠 (10 U/mL)	90%
木糖醇 (2.5%)	100%
内毒素提取液 (0.1%)	123%

PYROSTAR™ Neo+

PYROSTAR™ Neo+是一款不使用鲎血的冻干试剂,其包含基因重组技术制备的重组蛋白、合成显色底物和缓冲液成分等。与常规鲎试剂的性能相同,可通过显色法检测内毒素。

特点

- 与天然鲎试剂具有相同级联反应,与天然鲎试剂检测结果高度相关
- 内毒素特异性试剂,无(1→3)- β -D-葡聚糖假阳性风险
- 定量范围为0.001-50 EU/mL,灵敏度高,定量范围广
- 溶解后可冷藏保存约4 h, -30°C下可冷冻保存2周,可减少试剂浪费
- 不适用于卡塔赫纳生物安全议定书(不含杆状病毒)



Multi Test Toxinometer法 酶标仪法 动态显色法 内毒素特异性 重组级联试剂

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	产品规格
293-36941	PYROSTAR™ Neo+	0.001-50	25 tests ^{**} (2.7 mL用×1瓶)

※ 酶标仪法为50 tests(每孔检测约需使用50 μ L)。

原理

PYROSTAR™ Neo+是一款全新开发的高灵敏度内毒素特异性试剂。

其包含三种重组蛋白(鲎C因子、B因子和凝固酶原)和合成显色底物(Boc-Thr-Gly-Arg-pNA)。如下图所示,当待测样品中存在内毒素时,会激活具有内毒素依赖性的C因子并引起级联反应,随后合成显色底物被裂解,释放出对硝基苯胺(pNA),然后发生显色反应。

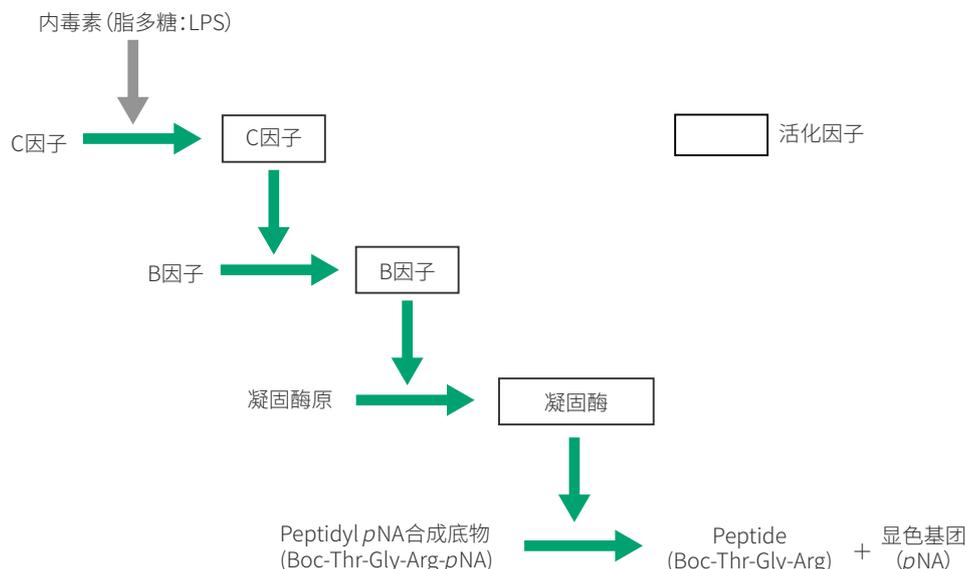
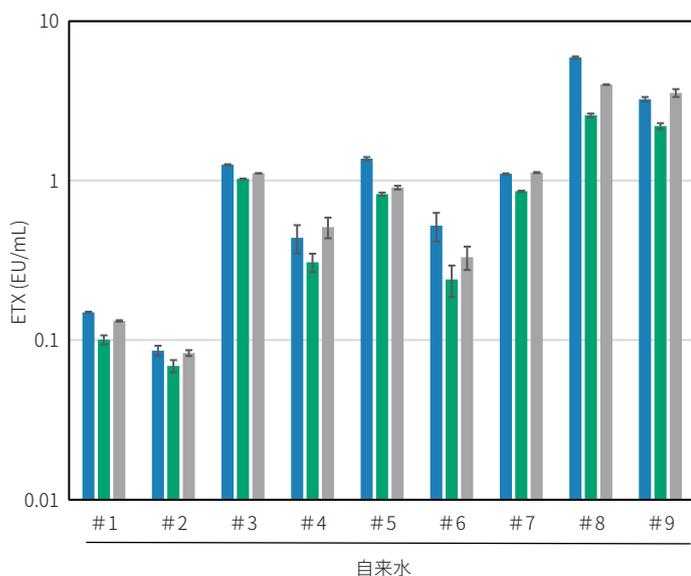


图1. PYROSTAR™ Neo+显色级联机制

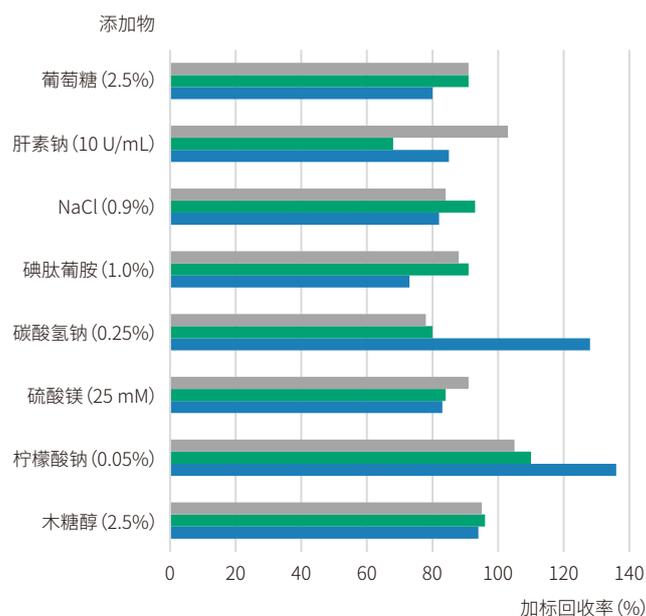
检测数据

使用常规鲎试剂和PYROSTAR™ Neo+检测自来水,确认它们对天然内毒素(Naturally Occurring Endotoxin:NOE)的反应性是否存在差异。



- PYROSTAR Neo+ (重组级联试剂)
- Limulus color KY (动态显色法试剂)
- ES-F/Plate (动态浊度法试剂)

使用常规鲎试剂(KY、ES-F/Plate)和PYROSTAR™ Neo+检测各样品,可得到相近的加标回收率。



- ES-F/Plate (动态浊度法试剂)
- Limulus color KY (动态显色法试剂)
- PYROSTAR Neo+ (重组级联试剂)

Limulus ES- II 系列

特点

- 不受样品的(1→3)-β-D-葡聚糖影响,可特异性检测内毒素
- 使用动态浊度法时,灵敏度为0.015试剂可实现低至0.0078 EU/mL的定量分析
- Single Test是预分装至反应试管的单个检测用鲎试剂,操作简便、可防止污染
- 长时间检测时,阴性对照(NC)也不会发生反应,可实现稳定的测试

Single Test



Multi Test



Single Test

Toxinometer法

动态浊度法

凝胶法

内毒素特异性

各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
295-51301	Limulus ES-II Single Test Wako 0.015	0.015	○	25 Tests
290-81401	Limulus ES-II Single Test Wako 0.03	0.03	○	25 Tests
296-81501	Limulus ES-II Single Test Wako 0.03	0.03	○	25 Tests

Multi Test

Toxinometer法

动态浊度法

凝胶法

内毒素特异性

各国药典

产品编号	产品名称	凝胶法灵敏度 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
299-51201	Limulus ES- II Test Wako 0.015	0.015	○	60 Tests (2 mL用×3瓶)
298-81201	Limulus ES-II Test Wako 0.03	0.03	○	50 Tests (5.2 mL用×1瓶)
290-51214	Limulus Amebocyte Lysate ES- II (LAL ES- II), lyophilized 0.015	0.015		50 Tests (5.2 mL用×1瓶)
292-51213	Limulus Amebocyte Lysate ES- II (LAL ES- II), lyophilized 0.015	0.015		100 Tests (2 mL用×5瓶)
293-35841	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized 0.03	0.03		50 Tests (5.2 mL用×1瓶)
298-35911	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized 0.25	0.25		50 Tests (5.2 mL用×1瓶)

※ 凝胶法灵敏度是指用于凝胶法的灵敏度。在动态浊度法中,该灵敏度数值越小,所需反应时间越短。

※ 工作标准品CSE (Control Standard Endotoxin) 是从*E.coli* UKT-B菌体中纯化的内毒素冻干品,每瓶含500 ng内毒素、添加剂(甘露醇和甘氨酸),每个批次均标示由日本药典内毒素国家标准品标定的效价(EU/Vial)。

Limulus ES- II Plus CS Single Test Wako

特点

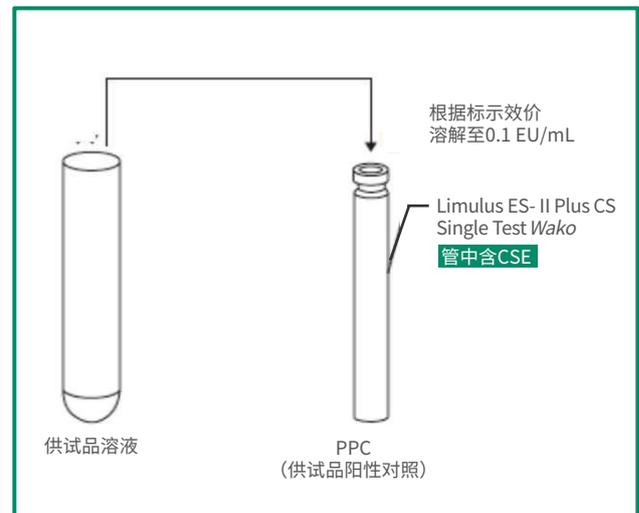
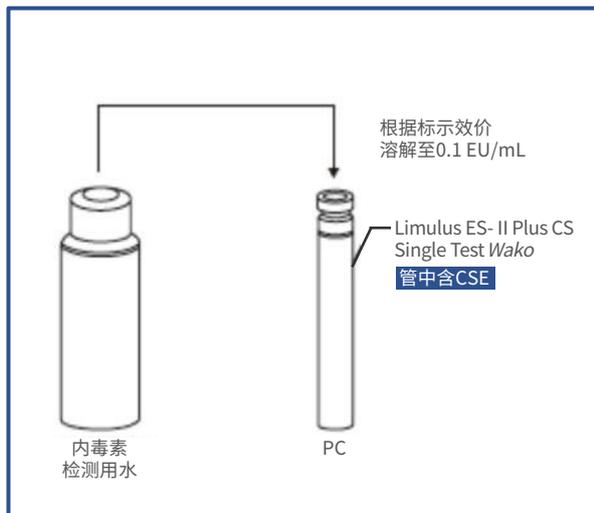
- 提供存档标准曲线数据
- PC和PPC可通过随附的CSE快捷制备
 - ※ PC:阳性对照;PPC:供试品阳性对照;CSE:内毒素工作标准品
- 鲎试剂Limulus ES-II Single Test Wako 0.015,
 - 不受样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖的影响,可特异性检测内毒素
 - ※ 可使用Toxinometer ET-7000进行检测
 - ※ 本试剂盒使用存档标准曲线和低浓度CSE,与药典中的内毒素检测法有所差异

提供存档标准曲线数据

试剂盒中配有标准曲线数据表,仅需将激活时间输入软件中即可使用。由于无需制备标准溶液和进行标准曲线检测,可节省操作时间、减少试剂和稀释用试管等耗材的消耗。



PC和PPC的制备



Limulus ES- II Single Test Wako中分装了低浓度的CSE(内毒素工作标准品),瓶身标示了使用日本药典内毒素国家标准品(JP-RSE)进行检测的效价。PC和PPC可通过将CSE冻干品溶解至标准曲线的中点浓度(0.1 EU/mL)制备而成。使用内毒素检测用水溶解CSE可制备得PC;直接使用样品溶液溶解CSE则可制备得PPC。

※ 向CSE试管中添加Limulus ES- II Single试剂时,建议使用BioCleanTip Wako Extend S II。

Single Test Toxinometer法 动态浊度法 内毒素特异性 简便法

产品编号	产品名称	检测范围 (EU/mL)	工作标准品 CSE	产品规格
299-77201	Limulus ES- II Plus CS Single Test Wako	0.01-1	○ (低含量)	32 Tests [※]

(Limulus ES- II Single试剂0.2 mL×32瓶,低含量CSE×16瓶,标准曲线数据表×1)

※ 在标准Protocol中使用,相当于可检测8个样品。

内毒素标准品

请使用符合检测目的内毒素标准品。

按照日本药典,进行检测时,须使用日本药典国家标准品。

日本药典国家标准品(一级标准品)

产品编号	产品名称	产品规格
634-58631	Japanese Pharmacopoeia Endotoxin RS (Endotoxin 10000)	10,000 EU
638-01021	Japanese Pharmacopoeia Endotoxin RS	10,000+ EU

※ 638-01021的标准品将于2025年停止销售。

美国药典国家标准品(一级标准品)

产品编号	产品名称	产品规格
531-13371	USP Reference Standard Endotoxin EC-6	10,000 UN

日本药典内毒素工作标准品(二级标准品)

产品编号	产品名称	产品规格
293-16541	Control Standard Endotoxin	500 ng/瓶

※ 使用本产品时,需对效价进行标定,标定方法请联系富士胶片和光客服。

※ Wako鲎试剂随附的CSE经对应批次鲎试剂进行效价标定。

美国药典内毒素工作标准品

特点

- 来源于*E. Coli* UKT-B
- 可用于阳性对照和制作标准曲线
- 可提供适用于特定批次LAL的RSE/CSE比率
- 溶解后可在2-10°C下存储1个月



产品编号	产品名称	产品规格
546-10061	Control Standard Endotoxin	6瓶(500 ng/瓶)

内毒素检测用提取液

特点

- 适用于医疗器械的内毒素测试
- 可提取水和生理盐水无法提取的内毒素
- 含有人血清蛋白 (HAS)



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
293-51601	内毒素检测提取液	内毒素检测用	4×10 mL

使用方法

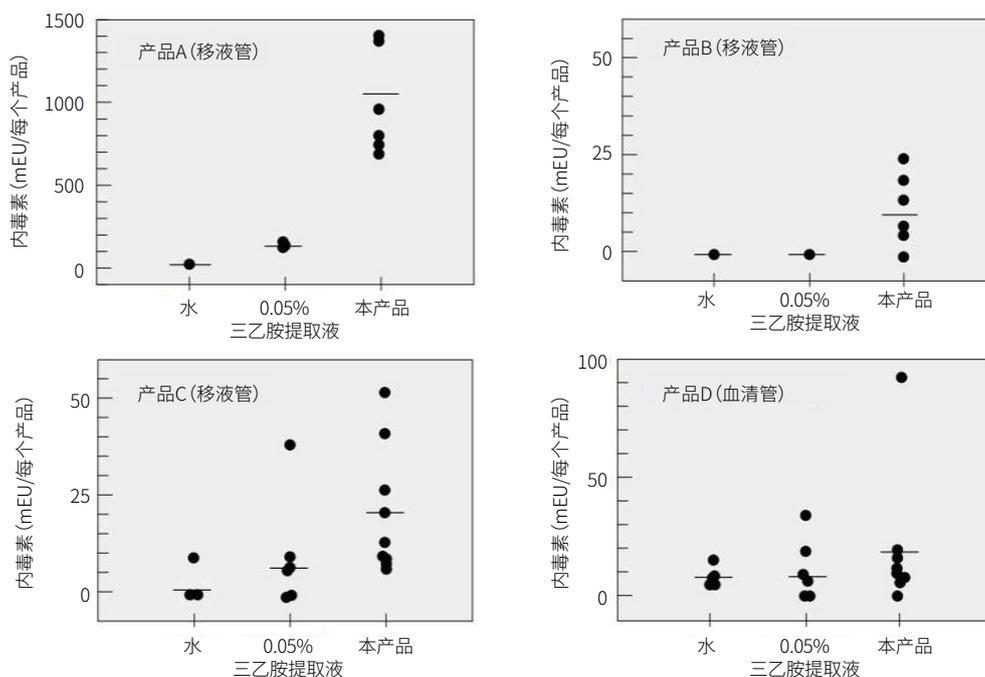
1. 制备内毒素检测用提取液

将1瓶 (10 mL) 本产品与190 mL无内毒素水混合 (稀释20倍)。

2. 使用步骤

取一定量的内毒素检测用提取液, 浸泡器械等样品, 或者向样品中添加提取液并轻轻搅拌, 随后在室温下放置约1 h。再次轻轻搅拌, 检测提取的内毒素。

使用不同的提取液对市售的无菌器械进行内毒素污染检测



使用市面上不同提取液对无菌设备/器械进行内毒素污染检测

参考文献

- 1) 井上勝二、高岡文、土谷正和、松浦脩二: 日本動物実験代替法学会第6回大会要旨集、110 (1992)
- 2) 井上勝二、原田和明、土谷正和、松浦脩二: 日本防菌防黴学会第21回大会要旨集、44 (1994)

LAL试剂用水

特点

- 无内毒素水 (<0.001 EU/mL)
- 蒸汽灭菌 (符合美国药典标准)
- 来源于美国药典注射用水
- 与鲎试剂不反应



产品编号	生产商编号	产品名称	产品规格
547-10091	LRW-2030	LAL Reagent Water, 30 mL	20×30 mL
546-10321	LRW-12125	LAL Reagent Water, 125 mL	12×125 mL

ES-Buffer内毒素特异性缓冲溶液

特点

- 每瓶缓冲液最多可制备5.2 mL鲎试剂
- 适用于任何可能与葡聚糖发生反应的非特异性鲎试剂, 从而制备内毒素特异性鲎试剂



产品编号	生产商编号	产品名称	产品规格
548-10381	ESB-0006	ES Buffer	6×6 mL

内毒素指示试剂LPS

特点

- *E. coli* 055:B5 (>100,000 EU/瓶)
- 每瓶可制备多个内毒素指示试剂
- 可用于研究验证



产品编号	生产商编号	产品名称	产品规格
545-10391	WLPS-0100K	LPS for Endotoxin Indicator	6瓶 (>100,000 EU/瓶)

热原检测试剂

家兔热原检测替代法

LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit

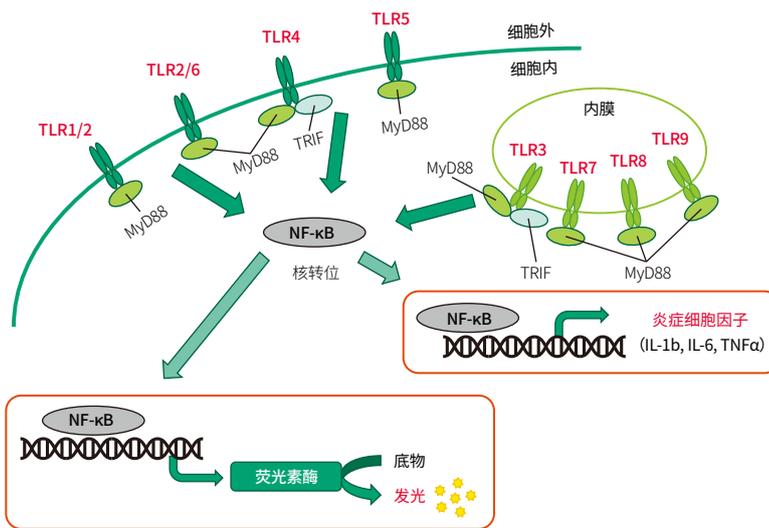
LumiMAT™ 是基于MAT法(单核细胞活化反应测定法, Monocyte Activation Test)开发的热原(Pyrogen)检测试剂盒。热原是导致人和动物体温升高的物质的总称,非口服药和直接接触血液的医疗器械不可被热原污染。家兔热原检测是早期广泛用于热原检测的实验方法,该方法通过向兔静脉中注射待测样品并观察其体温变化来判断是否存在热原。但家兔热原检测在再现性、精确度、成本等方面存在问题,因此鲎试剂作为替代法被广泛使用。然而,鲎试剂无法检测出非内毒素热原,因此必要时也会使用家兔热原检测。MAT法作为家兔热原检测的替代法而开发的*In vitro*热原检测实验,不仅可检测内毒素,还能检测非内毒素热原。

特点

传统方法	使用人血液来源PBMC	LumiMAT™	使用报告基因稳定表达的细胞
实验时间: 1.5天 添加样品后,需在检测前培养约24 h		快速实验 (5 h)	添加样品后, 仅需3 h即可完成检测
检测: ELISA 使用ELISA法检测释放的细胞因子 检测时间长、操作步骤多		简单方便的报告细胞检测	仅需向细胞培养板中 添加发光底物
细胞: PBMC (外周血单核细胞) 因血液捐献者不同,批次间差异大 在供应稳定性上存在问题		批次间差异小 可稳定供应的细胞系	使用报告基因可稳定表达的细胞系 批次间差异小,再现性高 通过建立主细胞库(MCB) 可实现稳定供应

检测原理

LumiMAT™ 使用单核细胞系NOMO-1,其引入荧光素酶报告基因,通过表达荧光素酶蛋白以响应因暴露于热原而激活的NF-κB信号。当热原与Toll样受体(TLR)结合后,NF-κB信号会被激活,从而表达荧光素酶蛋白。当向其加入发光底物后,会发生发光反应,可通过检测发光强度检测热原。



产品列表

产品编号	产品名称	产品规格
298-36991	LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells	96 Tests
297-96801	LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set	96 Tests

※ 进行检测时,需要LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells和LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set配合使用。

< LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Reagent Set >

细胞培养基 ······ 20 mL
 稀释用培养基 ······ 100 mL
 发光检测缓冲液 ······ 12 mL
 发光底物 ······ 240 μL

< LumiMAT™ Pyrogen Detection Kit - Cells >

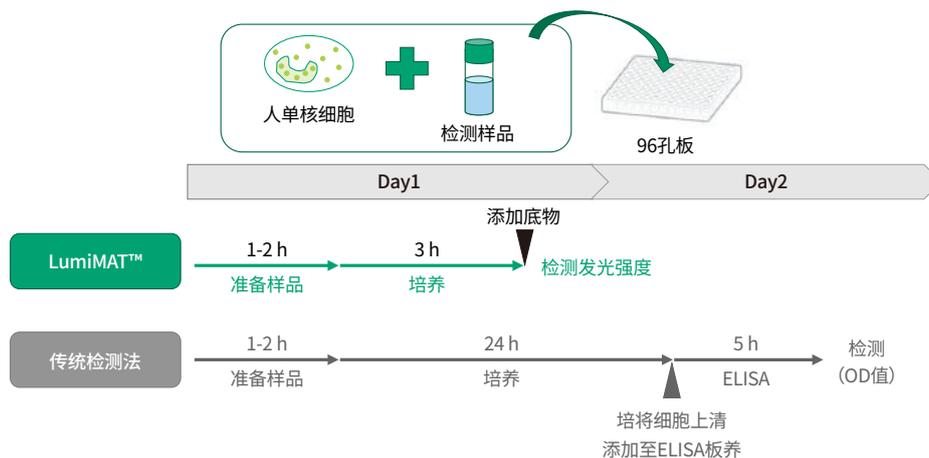
LumiMAT™ 细胞 ······ 350 μL

相关产品

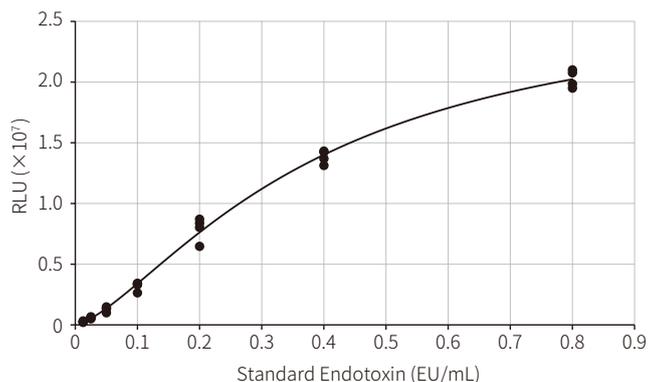
产品编号	产品名称	产品规格
292-37011	Toximaster™ FQC1 Software PC Set E for LumiMAT™	1 Set
-	IQOQ	-

检测步骤

向96孔板中添加待测样品或内毒素标准品,添加报告细胞后孵育3 h。然后添加发光底物,使用酶标仪检测发光强度。与传统的ELISA法检测相比,LumiMAT™ 在同一个微孔板中进行检测,可减少实验差异。此外,传统方法需要1.5天,而LumiMAT™ 仅需5 h左右即可得到检测结果。



标准曲线



使用内毒素标准品制作标准曲线,以Endotoxin Equivalents (EE)/mL 计算热原含量。

标准曲线范围:0.0125~0.8 EE/mL

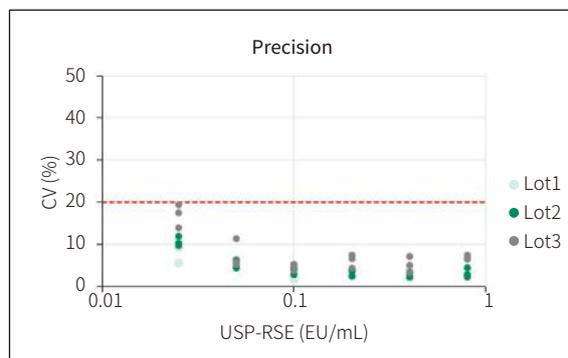
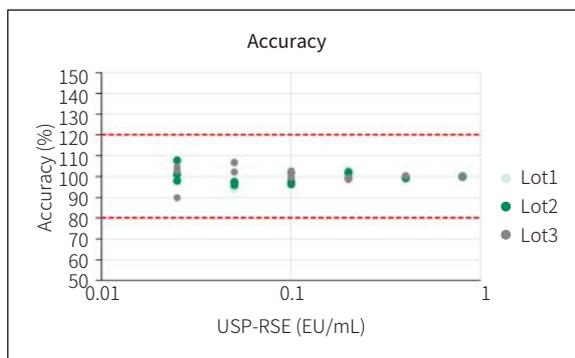
RLU:Relative Light Unit (相对光强度)

EU:Endotoxin Unit (内毒素单位)

再现性数据

使用3个批次的LumiMAT™,检测准确率和精确度 (n=4,各批次分别检测3次)。添加6个浓度的内毒素标准品 (USP-RSE),根据标准曲线计算浓度 (EU/mL)。

已确认所有批次的准确率(检测值/标准值)都在±10%以内,精确度都在CV20%以下,具有高再现性。



特点

内毒素检测仪Toxinometer的专用试剂，可检测肽聚糖和β-葡聚糖。

※ 仅可定量肽聚糖，不能定量β-葡聚糖。



Single Test

Toxinometer法

肽聚糖

β-葡聚糖

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
296-81001	SLP-HS Single Reagent Set II	微生物检测用	20 Tests

相关产品

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
030-09903	Curdlan	生化学用	1 g

试剂盒组成

内容物	规格
SLP-HS Reagent II (蚕幼虫血浆试剂)	0.1 mL用×20瓶
SLP-溶解液	5 mL用×2瓶
标准溶液(金黄色葡萄球菌的消化肽聚糖)	0.5 mL用×1瓶

灵敏度:30°C时,使用Toxinometer可分别在105 min内检测出10 pg/mL肽聚糖,100 min内检测出1 pg/mL凝胶多糖。

原理

蚕(*Bombyx mori*)的体液内存在着被称为酚氧化酶前体(ProPO)级联的生物防御机制,通过与肽聚糖(PG)以及(1→3)-β-D-葡聚糖(β-葡聚糖)反应,最终使酚氧化酶前体(ProPO)转化为酚氧化酶(PO)。proPO的活化机制是包含多种丝氨酸蛋白酶前体活化的级联机制。该级联机制在异物入侵昆虫体内时观察黑色素形成过程中发挥了重要的作用。SLP试剂是通过无菌采集蚕幼虫体液制备而成的冻干试剂,包含酚氧化酶前体(ProPO)级联的全部因子。本试剂通过肽聚糖(PG)和β-葡聚糖活化,并氧化反应底物DOPA(L-3,4-二羟基苯丙氨酸),生成黑色素。肽聚糖(PG)存在于大多数细菌的细胞壁中,而β-葡聚糖存在于大部分真菌的细胞壁中,因此将生成的黑色素作为指标,可检测出各种微生物。

SLP试剂的活化机制如图1所示。肽聚糖(PG)或β-葡聚糖分别与其识别蛋白(PGRP与βGRP)结合,引发酚氧化酶(ProPO)级联反应,最终使酚氧化酶前体(ProPO)转化为酚氧化酶(PO)。活化后的PO可氧化底物中的DOPA,最终生成黑色素。

可使用鲎血提取物(鲎试剂)检测的内毒素不会活化SLP级联机制,因此SLP试剂可用于检测鲎试剂无法检测的肽聚糖(PG)(图1)。

SLP试剂虽然会对各类细菌来源的肽聚糖(PG)和带有β-1,3-糖苷键的β-葡聚糖产生强烈反应,但几乎不与作为革兰氏阴性菌细胞壁成分的脂多糖(内毒素)发生反应。肽聚糖(PG)存在于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌中,因此SLP试剂可与革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌等多种常见细菌发生反应。此外,SLP试剂还能与真菌中的β-葡聚糖发生反应,因此被认为能与所有微生物发生反应。

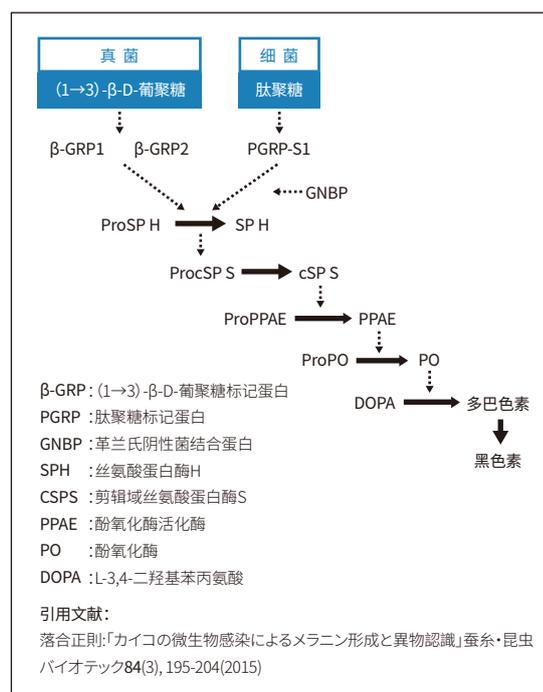


图1. SLP试剂的前酚氧化酶级联反应

内毒素检测用仪器

内毒素检测仪 Toxinometer ET-7000

特点

- 根据试剂不同,适用于动态浊度法、动态显色法、凝胶法3种检测法(也适用重组级联试剂)
- 单模组可检测16~512个样品
- 最多可8个模组共同使用
- 操作简单,每个孔独立检测,即使是初次使用的用户也可轻松操作
- 配合专用软件“Toximaster”使用,符合药典、ER/ES指南和FDA 21 CFR Part11标准
- 符合日本海外认证标准C-UL (CSA) · CE



产品编号	产品名称	组成
293-36061	Toxinometer ET-7000	Toxinometer ET-7000 (1台)

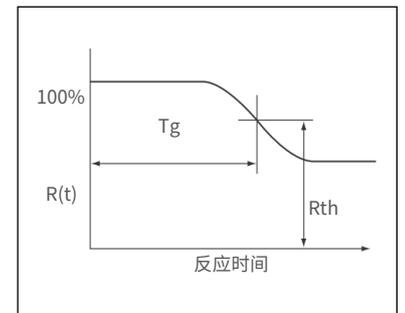
相关产品

项目	产品编号	产品名称	组成
Part11套装	293-36061-FQC1	Toxinometer ET-7000, with FQC1 Part 11 & 240V power cord cable	Toxinometer ET-7000 (1台) 电脑 (1台) Toximaster FQC1软件 系统验证资料
非Part11套装	293-36061-FQC1 Lite	Toxinometer ET-7000, with FQC1 Lite non-Part 11 & 240V power cord cable	Toxinometer ET-7000 (1台) Toximaster FQC1 Lite软件

检测原理

Toxinometer通过捕获430 nm处透光量的变化来检测内毒素和试剂之间的反应。透光量在反应开始后的一段时间内达到稳定,随着反应进行透光量逐渐减少,在反应完成后停止减少和变化。设透光量 $l(t)$ 反应初期与透光量 l_0 的比值为 $R(t)$,透光量比的变化阈值为 R_{th} ,反应开始 $R(t)$ 达到 R_{th} 的时间为凝胶化时间 T_g 或激活时间 T_a 。

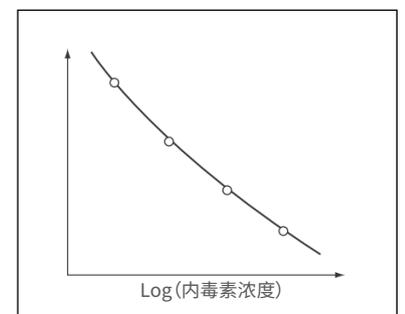
$$R(t) = [l(t) / l_0] \times 100\%$$



反应时间进程

定量

内毒素浓度与凝胶化时间 T_g 之间存在标准关系,可根据样品的凝胶化时间计算内毒素浓度。



标准曲线

规格

项目	内容
功能	透光度检测功能(可同时检测16个样品)
	温度调控功能
	自动检查光度功能
光源	超亮蓝色LED, 中心波长430 nm
检测器	硅光电池
温度控制	干浴法, 30±1.0°C / 37±1.0°C (温度由ET-7000软件设置)
	预热时间 20 min (设定温度 37°C, 环境温度 25°C)
显示	通过各种LED显示检测状态 通过各种LED显示错误和检查信息
重量	6.3 kg (±10%)
尺寸	W 190mm×D 420mm×H 130mm (不含突起部分)

项目	内容
电源	AC 100-240 V (±10%)
频率	50/60Hz
功率	最大120W
使用环境	37°C温度控制下: 环境温度: 15~30°C, 湿度: 30~85%。 ※ 相对湿度应保持在一定水平以下, 以防止水汽凝结
	30°C温度控制下: 环境温度: 15~25°C, 湿度: 30~85%。 ※ 相对湿度应保持在一定水平以下, 以防止水汽凝结
存储环境	环境温度: -15~60°C, 湿度: 30~85% ※ 相对湿度应保持在一定水平以下, 以防止水汽凝结
安装场所	室内
高度	2000 m以下

内毒素检测软件 Toximaster FQC1、Toximaster FQC1 Lite软件

特点

- 控制内毒素检测设备Toxinometer的专用软件
- 符合各国药典的内毒素检测法
- 支持内毒素检测的各种数据处理和报告导出
- 符合厚生劳动省的ER/ES指南和FDA 21 CFR Part11 (FQC1 Lite版本不支持该功能)

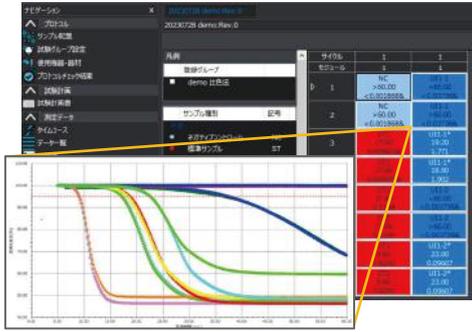


FQC1、FQC1 Lite功能一览表

项目		Toximaster FQC1	Toximaster FQC1 Lite
支持	符合各国药典的内毒素检测法	○	○
	符合日本厚生劳动省的ER/ES指南和美国FDA 21 CFR Part11	○	
	符合数据完整性合规性	○	
各种功能	用户账号登录功能	○	○
	设定使用权限(权限分组)	○	
	检测审批功能 (检测计划复核【review】、检测结果确认【confirm】和检测结果审批【approve】)	○	
	电子记录/电子签名	○	
	检测	○	○
	各类信息录入功能(检测试剂、标准品、样品信息)	○	○
	连接LIMS	○	○
	归档/检索功能	○	○
审计追踪功能	○	○	
备份/恢复出厂设置功能	○	○	

各种功能

■ 支持内毒素测试



可根据检测设备发送的动力学数据, 求出各测试样品的激活时间并计算检测结果。

■ 信息录入功能



可在检测Protocol中录入试剂、标准品、样品等多种信息, 助力提高检测效率。

■ 用户账号管理



支持账号管理, 软件仅对已注册用户可用。通过验证电子记录和电子签名, 可防止数据伪造和篡改 (Toximaster FQC1 Lite版本不支持该功能)。

■ 审计跟踪 (Audit Trail)



登录软件、登出软件、确认测试计划、与测量相关等各种操作及其他各种操作都带有时间戳记录 (Toximaster FQC1 Lite版本不支持测试计划的确认和审批功能)。

■ 检测计划和检测记录的复查和审批



检测前对检测计划复核 (Review), 以及检测后对检测记录的确认 (Confirm) 和审批 (Approve) 可在 workflow (Workflow) 中注册设置。设置 workflow 可提高电子记录和电子审批的可靠性 (Toximaster FQC1 Lite版本不支持该功能)。

FQC1、FQC1 Lite设备对应表

设备	软件	
	Toximaster FQC1	Toximaster FQC1 Lite
Toximaster ET-7000	○	○
EPOCH2	○	○
KLANOS™	○	

※ 不适用于停止销售的旧版本机器。

内毒素检测相关耗材

进行内毒素检测时必须使用无内毒素的仪器。250°C以上的温度下进行30 min以上的干热灭菌即可灭活内毒素，因此通常会使用经干热灭菌的玻璃仪器。洗脱出的微量金属离子 (Fe、Al、Ga、Cr 等) 会影响检测结果，因此需要避免使用金属仪器。

FUJIFILM Wako可提供无内毒素检测耗材。

通常情况下，塑料产品可能会吸附内毒素，而BioClean系列产品可保证无内毒素且不会吸附内毒素。使用其他塑料产品时，请与玻璃仪器进行对比或确认后使用。

- ① 无内毒素污染
- ② 不吸附内毒素
- ③ 不会洗脱出影响检测结果的物质

BioClean系列

特点

- 无内毒素
- 独立包装
- 经 γ 射线灭菌



■ 内毒素检测用枪头

产品编号	产品名称	产品规格	数量
294-35011	BioCleanTip Wako Extend S II	200 μ L	100 支
291-35021	BioCleanTip Wako 200 II	200 μ L	100支
298-35031	BioCleanTip Wako 1000 II	1000 μ L	100支

■ 内毒素检测用96孔板

产品编号	产品名称	数量
293-35221	BioCleanPlate Wako™ (Microplate)	50 个

干热灭菌试管、铝盖

特点

- 无内毒素污染
- 每10支独立包装
- 已干热灭菌



产品编号	产品名称	产品规格	数量
292-32751	Limulus Test Tube-S with Aluminum Cap	12×75 mm	80 pcs
293-26551	Limulus Test Tube-S	12×75 mm	100 pcs
293-28251	Aluminum Cap-S ^{※1}	15×18 mm	100 pcs
290-13751	Aluminium Cap-M ^{※2}	10.5×11.3 mm	100 pcs

※1 适用于13×100 mm和12×75 mm的试管。 ※2 适用于10×75 mm的试管。

凝胶法试管

特点

- 无内毒素污染
- 适用于凝胶法
- 硼硅玻璃材质



产品编号	生产商编号	产品名称	产品规格	数量
542-10301	CT-1075	Gel-clot Reaction Tube	10×75 mm	200 支/盒
549-10311	CT-1075B	Gel-clot Reaction tube, BULK	10×75 mm	1250 支/盒
542-10281	DL-13100	Depyrogenated Dilution Tube	13×100 mm	50 支/盒

上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片 and 光(广州) 贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002、3003、3011室

北京 Tel:13611333218

上海 Tel:021 62884751

广州 Tel:020 87326381

香港 Tel:852 27999019

询价:wkgz.info@fujifilm.com

官网:labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

