

TransDetect[®] Recombinant Factor C Endotoxin Detection Kit 重组C因子内毒素检测试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DC101

版本号: Version 1.0

保存: 试剂盒于2-8℃保存一年。未溶解的内毒素标准品冻干粉于2-8℃保存一年，复溶后的50 EU/ml内毒素于2-8℃可保存60天，再次稀释后的内毒素需当天使用完毕。试剂盒使用过程中注意避免污染，使用后及时放回2-8℃。



目 录

1. 产品说明	1
2. 检测原理	1
3. 产品特点	1
4. 产品组成	1
5. 自备材料设备	1
6. 酶标仪荧光信号调节规范	1
7. 操作步骤	2
8. 数据分析	4
9. 样品制备与处理方式	5
10. 注意事项	6

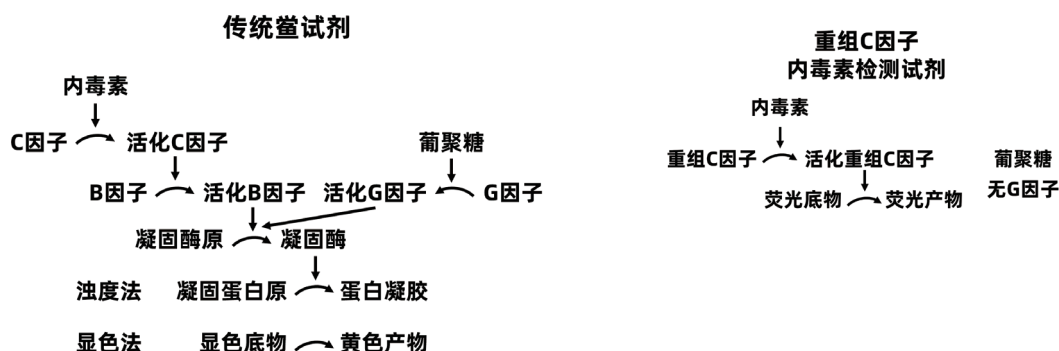


产品说明

TransDetect® Recombinant Factor C Endotoxin Detection Kit是一款不依赖鲎血，不受G因子干扰，可用于细菌内毒素检测的试剂盒，采用先进的重组C因子技术，为制药、医疗器械、生物制品等行业提供高效、准确、可靠的内毒素检测解决方案，以满足各行业对内毒素检测的严格质量控制需求。

检测原理

本产品利用基因重组技术表达的重组C因子蛋白（Recombinant Factor C, rFC），该蛋白能够特异性地与内毒素结合并被激活，激活后可酶切水解特定的荧光底物，产生荧光信号。荧光信号强度与内毒素的含量成正相关，通过检测荧光信号强度，即可定量检测样本中的内毒素含量。该方法仅利用了鲎试剂级联反应第一步，避免了后续级联反应中G因子的干扰，检测结果更加稳定和准确。原理示意图如下。



产品特点

- 高灵敏度：检测范围为0.005-5 EU/ml，能够精准检测低浓度内毒素，满足对灵敏度要求极高的应用场景。
- 高特异性：有效消除了传统鲎试剂方法中β-1,3-葡聚糖等干扰因素，只对细菌内毒素产生反应，极大地提高了检测的特异性和准确性。
- 无动物源性成分：采用重组技术生产，不依赖于动物源性成分，降低了对鲎资源的依赖和捕捞压力，同时可实现长期稳定供货和批间一致性。
- 良好的抗干扰能力：可兼容于多种缓冲体系，适用于不同类型样本的检测。

产品组成

Component	DC101-01 (96 T)
rFC Enzyme Solution	1.2 ml
Fluorogenic Substrate Solution	6 ml
Assay Buffer	5 ml
Bacterial Endotoxin Standard	1 vial
Pyrogen-free Water	30 ml
细菌内毒素检查反应板	一块

自备材料设备

一次性无热原玻璃稀释管、无热原的吸头、漩涡振荡器、恒温培养箱、酶标仪（可检测360 nm/460 nm荧光）

酶标仪荧光信号调节规范

1. 荧光信号单位特性

荧光信号通常以相对荧光单位（RFU）记录，其本质为真实荧光信号转换后的电子信号，可通过设置仪器的增益进行调整，因此RFU属于任意单位。



2. 灵敏度调节原则

根据检测信号强度需灵活调整仪器参数：信号微弱时，可提高增益/灵敏度设置以增强信号；信号过强时，需降低增益/灵敏度设置避免信号溢出。

3. rFC检测的灵敏度要求

在rFC内毒素检测中， $\lg(\Delta RFU)$ 与 $\lg(\text{内毒素浓度 EU/ml})$ 呈对应关系，灵敏度设置直接影响检测有效性。灵敏度过低：难以捕捉最低标准品的荧光信号；灵敏度过高：最高标准品的荧光信号会超出检测范围。因此，实验前须确定适宜的检测灵敏度。

4. 灵敏度设置实例

以Biotek Synergy2酶标仪（荧光检测范围0-99999）为例：需确保所有检测点荧光值在仪器检测范围内，0.5 EU/ml对应的RFU范围建议为1000-10000，对应对数范围3-4，对数中点为3.5；据此，0.5 EU/ml的目标绝对净RFU约为3000，且建议将其作为该浓度的最小阈值，以保证日常检测中阴性对照与最低标准间有足够间隔。

5. 仪器差异注意事项

由于不同品牌酶标仪的软件功能存在差异，具体操作请参阅对应仪器的用户手册。

操作步骤

（一）样品制备

1. 样品污染防控与保存

待测样品需严格避免微生物或内毒素污染。所有与样品、检测试剂直接接触的材料均需确保无热原；样品稀释在无热原玻璃管中，使用无热原水进行操作。若样品无法及时检测，建议冷藏或冷冻保存。

2. pH值调节规范

由于rFC内毒素检测试剂的内毒素测定是基于酶促反应，需维持样品pH值在6-8范围内。若样品pH值超出此范围，需使用无内毒素的氢氧化钠、盐酸或其他缓冲溶液进行调节。关键注意事项：待测样品不可直接接触pH电极进行调节，以免电极污染引入内毒素导致假阳性结果，务必通过预实验确定适宜的pH调节方法。

3. 样品稀释

对检测无干扰的样品可直接用于检测；对检测有干扰的样品需稀释至无干扰浓度，稀释过程中需充分漩涡震荡 ≥ 2 min；内毒素检测干扰多数因样品组分浓度过高，多数情况下通过适度稀释可有效克服干扰。稀释倍数需通过预实验进行确定。

4. 样品的稀释倍数

样品的稀释倍数应小于样品的最大有效稀释倍数，样品最大有效稀释倍数（MVD）按照以下公式计算。其中内毒素限度是未稀释样品中可接受的内毒素浓度最大值，测定灵敏度是检测试剂的最低检测限度（本试剂盒的最低检测限度为0.005 EU/ml），样品的最大稀释倍数计算如下：

$$\text{MVD} = \frac{\text{内毒素限度 (EU/ml)}}{\text{测定灵敏度 (0.005 EU/ml)}}$$

5. 样品适用性研究

检测样品内毒素含量需开展适用性研究，通过考察样品内毒素检测的加标回收率判断是否存在干扰。加标回收率在50%-200%之间，即为无干扰；若存在干扰，需对样品进一步预处理（如调节pH值、稀释等），直至干扰消除。干扰与否的判断例举说明如下：



样品稀释倍数	内毒素浓度 (EU/ml)			加标回收率	样品干扰与否	样品内毒素实际浓度
	未加标	加标	差值			
10	0.083	0.256	0.173	34.6%	干扰	未知
40	0.017	0.507	0.49	98%	无干扰	0.68 EU/ml

1) 加标内毒素浓度为0.5 EU/ml;

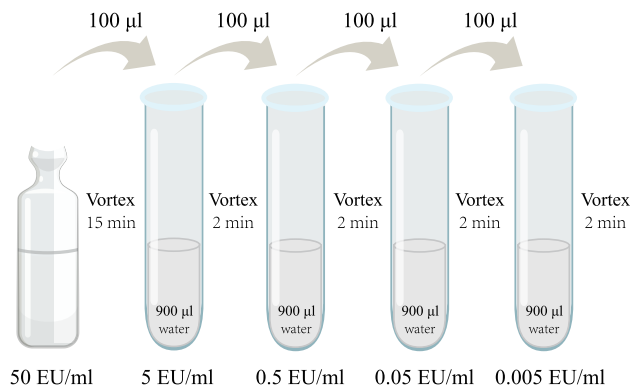
2) 加标回收率% = (样品加标内毒素浓度 - 样品未加标内毒素浓度) / 加标内毒素浓度 × 100%。

(二) 内毒素标准品配制

1. 溶解内毒素标准品

按产品标签标注所示内毒素含量，向内毒素标准品冻干粉中加入合适体积的无热原水，配制成50 EU/ml标准品。例如80 EU的内毒素标准品需加入1.6 ml无热原水，并漩涡震荡≥15 min。冷藏保存的内毒素标准品，使用前需平衡至室温，再漩涡震荡≥15 min后方可使用。

2. 制备内毒素工作标准品系列溶液：取4支一次性无热原玻璃稀释管，分别标注目标浓度（0.005、0.05、0.5、5 EU/ml），采用梯度稀释法从50 EU/ml母液制备系列标准品，示意图及具体配制方法具体如下：



内毒素标准品浓度 (EU/ml)	无热原水加量 (ml)	上一浓度标准品加量
5.0	0.9	0.1 ml 50 EU/ml标准品
0.5	0.9	0.1 ml 5 EU/ml标准品
0.05	0.9	0.1 ml 0.5 EU/ml标准品
0.005	0.9	0.1 ml 0.05 EU/ml标准品

注意：用标准内毒素制成溶液，制成至少3个浓度的稀释液（相邻浓度间稀释倍数不得大于10），最低浓度不得低于0.005 EU/ml；内毒素易吸附于塑料表面，必须使用玻璃稀释管，禁止用塑料管；稀释前需将上一浓度标准品溶液充分漩涡震荡≥2 min（如制备5 EU/ml前需震荡50 EU/ml母液，制备0.05 EU/ml前需震荡0.5 EU/ml溶液）；稀释后标准品溶液需立即使用，避免放置过久。

(三) 孔板加样并检测

1. 加样至测定板

向96孔无菌无热原反应板的对应孔中分别加入：100 µl阴性对照（无热原水）、100 µl内毒素工作标准品溶液、100 µl待测样品（设两组复孔），其中一组样品孔需额外加入10 µl 5 EU/ml内毒素工作标准品溶液，作为加标样品组。放入37℃培养箱中预热10-20 min。建议每次检测须同步测定内毒素工作标准品溶液，重新绘制标准曲线，所有样品设置加标组，以验证检测干扰情况。加样96孔板示意图如下：



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank 0	Blank 0	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL3	SPL3	SPL4	SPL4	SPL5	SPL5
B	STD 0.005	STD 0.005	SPLC1 0.5	SPLC1 0.5	SPLC2 0.5	SPLC2 0.5	SPLC3 0.5	SPLC3 0.5	SPLC4 0.5	SPLC4 0.5	SPLC5 0.5	SPLC5 0.5
C	STD 0.05	STD 0.05										
D	STD 0.5	STD 0.5										
E	STD 5	STD 5										
F												
G												
H												

图中，阴性对照记为Blank，内毒素工作标准品溶液记为STD，
未加标样品组记为SPL，加标样品组记为SPLC

2. 配制内毒素检测试剂

提前30 min取出荧光底物溶液、测定缓冲液和rFC酶溶液，平衡至室温。按“荧光底物溶液→测定缓冲液→rFC酶溶液”的顺序，荧光底物溶液：测定缓冲液：rFC酶溶液=5:4:1的比例，依次加入三种试剂并轻轻混合均匀，禁止漩涡。

3. 酶标仪参数设置

选择荧光检测，激发波长360 nm，发射波长460 nm。增益调节参照“内毒素检测中荧光信号调节规范”部分。

4. 向预热好的反应板孔中加入内毒素检测试剂

向所有内毒素标准品及样品孔中加入内毒素检测试剂，100 μl/孔。

5. 0小时读数

加样后立即读取“时间点0小时”的荧光值。

6. 1小时读数

将96孔板置于37°C±1°C温度下孵育1小时，随后读取“时间点1小时”的荧光值。

数据分析

1. 将酶标仪读取的0小时和1小时荧光值导出至电子表格。

2. 计算两个平行复孔的变异系数CV值， $CV = \text{STDEV} / \text{Average}$ ，CV小于等于10%则平行孔重复性合格，说明实验精密度和操作一致性符合要求，若大于10%则说明对应复孔重复性不合格，请重新对该样品进行检测。

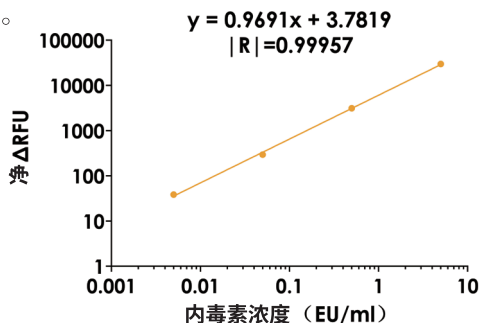
3. 计算各孔荧光变化值： $\Delta \text{RFU} = 1 \text{小时荧光值} - 0 \text{小时荧光值}$ 。

4. 计算净 ΔRFU ：净 $\Delta \text{RFU} = \text{标准品或样品} \Delta \text{RFU} - \text{阴性对照孔} \Delta \text{RFU}$ 。

5. 对标准品的平均净 ΔRFU 和浓度（EU/ml）分别取对数。

6. 绘制标准曲线：以lg(内毒素浓度)为横坐标，lg(净 ΔRFU)为纵坐标进行线性拟合，得到方程 $\lg(\text{净} \Delta \text{RFU}) = A \times \lg(\text{内毒素浓度}) + B$ 。要求标准曲线相关系数 $|R| \geq 0.980$ 。示意图如下。

内毒素浓度（EU/ml）	ΔRFU	净 ΔRFU
0	100	0
0.005	138.5	38.5
0.05	394.5	294.5
0.5	3216.5	3116.5
5	29904	29804



7. 计算样品及加标样品的内毒素浓度，按公式计算加标回收率：加标回收率% = (加标样品浓度 - 未加标样品浓度) / 加标浓度 (0.5 EU/ml) × 100%。
8. 若回收率在50%-200%之间，判定样品无检测干扰，结果可靠。
9. 对加标回收率合格的样品，结合稀释倍数计算未稀释样品的实际内毒素浓度。

样品制备与处理方式

1. 样品制备与处理通用原则

- 1) 基本溶解与稀释：大多数样品可直接使用无热原水进行溶解或稀释。
- 2) 包材浸提液制备：
 - 容器类包材：按标示容量加入无热原水，密闭后，在经确认的适宜条件下进行浸泡，制备浸提液。
 - 非容器类包材：将其置于经验证无内毒素且无干扰的器具中，按规定的液体系数加入无热原水，在适宜条件下进行浸提。

2. 难溶性或干扰样品的预处理

对于难溶性或可能存在干扰的样品，需进行预处理。预处理包括两个核心步骤：溶解样品和排除干扰。

- 溶解方法：加热处理、超声处理、调节pH值、添加适当助溶剂等。
- 排除干扰方法：使用无热原水或适宜缓冲液稀释、加热灭活、超滤、萃取等。
- 重要注意事项：对样品进行任何预处理后，必须通过干扰试验验证该方法是否可行。即，在样品中加入已知浓度的内毒素标准品，与样品同步进行预处理后，检测其回收率。确保预处理过程既不破坏内毒素，也不引入干扰。同时，预处理所用试剂本身的内毒素含量必须足够低，不影响实验结果。

3. 常见干扰因素及排除措施

下表总结了常见的干扰因素及其推荐排除方法。

干扰因素	干扰机制	排除措施
pH值	影响rFC酶活性	用无热原的稀酸/碱或Tris缓冲液调节至适宜pH
渗透压	影响rFC酶活性	使用无热原水稀释
螯合剂	影响rFC酶活性、导致内毒素聚集	使用含镁离子缓冲液的无热原水稀释
丝氨酸蛋白酶等非特异性蛋白质	影响rFC酶活性	稀释并结合加热处理
重金属/钙离子	影响rFC酶活性、导致内毒素聚集	用含1 mM EDTA的无热原水稀释
高浓度蛋白质	影响rFC酶活性、导致内毒素聚集	用无热原水或0.9%氯化钠溶液稀释，或结合加热
去污剂（表面活性剂）	影响rFC酶活性、导致内毒素聚集	使用无热原水稀释

4. 常见样品处理示例

以下为部分常见样品的推荐处理方法、稀释倍数及内毒素回收率供参考。



常见样品	抗干扰处理方法	稀释倍数	回收率
PBS	无热原水稀释	1	73%
DMEM	无热原水稀释	10	85%
RPMI-1640	无热原水稀释	50	71%
细胞冻存液	无热原水稀释	1	69%
右旋糖酐40氯化钠注射液	无热原水稀释	1	121%
复方氨基酸18AA注射液	无热原水稀释	5	65%
5%葡萄糖注射液	无热原水稀释	1	59%
人血白蛋白(20%)	无热原水稀释	200	70%
IL-2蛋白	PBS稀释	20	129%
HindIII酶	无热原水稀释	100	107%
艾美赛珠单抗制剂	无热原水稀释	5	65%
1 µg/ml质粒	无热原水或质粒稀释液稀释	20	82%
血清	95度加热5分钟+无热原水稀释	1000	87%
胰蛋白酶	95度加热5分钟+无热原水稀释	200	109%
无热原西林瓶浸提液	无热原水37℃浸泡一小时	1	87%

说明：上述回收率数据为示例，实际操作中需根据具体产品和试剂盒要求，通过干扰试验确定最适处理条件。

注：针对质粒样品，全式金可单独提供GW101质粒稀释液（内毒素检测专用），用于内毒素检测。

注意事项

- 操作环境：检测操作应在洁净、无污染的环境中进行，避免环境中的内毒素和其他杂质对检测结果产生干扰，若不确保开放式实验环境是否符合检测需求，可在超净工作台中进行操作。实验台面应保持清洁并在使用前进行清洁消毒。操作人员应穿戴整洁，佩戴口罩，避免自身携带的污染物接触试剂和样本。
- 试剂使用：使用前应将试剂盒从冷藏环境中取出，平衡至室温，以避免温度差异对试剂性能产生影响。试剂在使用过程中应避免剧烈振荡，防止产生气泡影响检测结果。不同批次的试剂请勿混用。
- 样本处理：样本采集和处理过程应严格按照操作规程进行，避免样本受到污染或其内毒素发生降解。对于含有抗凝剂、防腐剂等添加剂的样本，需验证这些添加剂不会对内毒素检测产生干扰。若样本需要保存，应在低温条件下储存，并尽快进行检测，避免长时间储存导致内毒素含量发生变化。
- 仪器维护：使用的荧光酶标仪应定期进行校准和维护，确保仪器的光学性能和温控性能符合要求。在每次使用前，应检查仪器的光源、探测器等部件是否正常工作。
- 废弃物处理：实验过程中产生的废弃物应按照生物安全相关规定进行处理，避免对环境造成污染。

