

摘要

细菌内毒素检测的关键就是配套用品。好的配套用品能够保证数据收集不受人为因素和干扰源的影响。选择无干扰的配套用品不仅是药典的规定，也是监管的要求。



MICROBIAL SOLUTIONS

用于细菌内毒素检测的鲎试剂（LAL）配套用品

有效的细菌内毒素检测（BET）结果需要依靠强大的测试程序，维护良好的设备以及经过适当培训的人员。无效的结果导致必须进行复测，从而导致LAL检测成本高昂。配套用品在BET实验室中起着重要作用。但通常，在选用BET配套用品的决策过程中，是成本而非质量在起到推动作用。

配套用品存在干扰的根本原因是由于LAL的质量或内毒素标准对照品（CSE）的效力受到了影响。LAL的活化可能是由于操作员接触污染或与含有痕量内毒素或葡聚糖的配套用品接触而引起的。我们可能会看到一些细微的影响，例如动态法BET研究中背景噪音的增加或阳性对照的回收率降低。当然，也会存在比较明显的影响，例如在1/4λ或用于凝胶法检测的阴性对照中出现凝胶。

由于标准溶液固有的低浓度，CSE的不稳定可能是产生内毒素检测中干扰的风险因素。这使得内毒素易受到可溶性杂质来源的影响，特别是可从塑料中萃取的物质。由于对聚集现象缺乏了解，随着时间的推移，内毒素标准品看似消失了一样。良好的配套用品和持续的涡旋混合是维持标准品效力的必要条件。最常见的问题是CSE失去效力，或动态法中的低浓度标准品受到污染。由于标准曲线是反应时间和内毒素浓度的反比关系，因此效价偏低的标准品系列可能导致分析结果偏高和阳性对照增强。更严重的是，效价过高的标准品系列可能会导致分析结果低估以及阳性对照的抑制。

在这一点上需要强调的是，上述效力的不稳定性仅是纯化的内毒素的特性，例如CSE试剂（通常来自大肠杆菌）中的脂多糖（LPS）。相反，环境（天然存在的）内毒素在水溶液中非常稳定并且可分散。内毒素的纯化去除了蛋白质成分，使得LPS比内毒素分散性差、稳定性低，并导致分子聚集增加、LAL活性降低和对哺乳动物的毒性降低。如果使用环境内毒素而不是LPS，则BET实验室将不需要涡旋混合器，因为它在溶液中其效力可以维持多年不变。

塑料用品

尽管塑料材料的制造过程中受到内毒素污染的风险非常低，但是一旦被污染，塑料制品可能是BET实验室中最成问题的配件。BET总则中警告：“如果将塑料设备（例如微孔板和移液器吸头）用于自动移液器，请仅使用已证明不含可检测到的内毒素且不会干扰测试的塑料设备。”

移液器

一次性塑料移液器释放的污染物会导致LAL试剂发生部分激活。例如在动态法LAL研究中，在LAL复溶、样品稀释和CSE溶液中使用一次性塑料移液器通常会引起少量污染。去热原玻璃移液器是分配LAL的最佳选择。

棉花和其他纤维素材料在鲎试剂的应用中问题很大。棉花可能含有内毒素和葡聚糖，是含有大量鲎试剂反应性葡聚糖（LRG）的最简单的纤维素形式。因此，细菌内毒素实验室应禁止含有保护棉或纤维素塞的移液器。

移液器吸头

聚丙烯移液器吸头通常用于转移LAL和其他用于LAL检测的检测成分。据我们所知，最近没有关于用于LAL分配的聚丙烯移液器吸头产生干扰或污染的报告。我们应禁止使用无菌移液器吸头来复溶LAL，也不应用于CSE复溶和稀释液制备。回顾有关细菌内毒素应用中的 λ 和阴性对照的历史数据可大体上确认一个品牌的移液器吸头没有产生干扰。切勿使用带滤芯吸头，可能会引发问题。

聚苯乙烯管

无菌的一次性聚苯乙烯管被普遍认为是适合用于制备内毒素标准品的惰性容器。

内毒素标准品在聚苯乙烯管中的稳定性和在硼硅酸盐管中相当。由容器造成的CSE效力损失最初归因于聚丙烯的吸附。后来包括我们实验室在内的各种研究发现，损失实际上是从聚丙烯容器萃取的未知强力抑制剂造成的。如选择非玻璃容器采集水样，需要验证以确保没有抑制剂。理想的采集容器应当不易碎、热稳定，并且不含干扰细菌内毒素实验的可萃取成分。水系统验证的一部分是识别和验证用于采集和存储水样本的特定无干扰容器。

分液管

BET实验室的常规做法是使用无菌的分液管分配LAL，例如Eppendorf™ biopore 5 mL Combitip®，根据我们的经验来说，是不含内毒素的，正如在凝胶法和动态法BET研究中获得的非反应性阴性对照所表明的一样。但是有报道称，其他供应商生产的类似产品存在LAL污染问题。Charles River的经验同时表明，使用0.5mLCombitip®进行10μL内毒素加标是凝胶法和BET动态法中制备加标阳性对照品的最准确、最有效和最稳定的方法。

微孔板

聚苯乙烯微孔板可能是质量控制中最受关注的一个项目，因为超过一半以上的LAL检测是在微孔板中进行的。微孔板的制造需要清洁的环境，以避免灰尘和污垢传播内毒素和LAL反应物质。一些品牌的微孔板由于“热孔 (hot well)” 的出现而受到影响，在这些孔中似乎随机出现了反应过度的孔。适用于LAL的微孔板在培养过程中不会在样品或标准品中产生非特异性凝胶或高反应性。因此，微孔板供应商的筛选程序应确保微孔板反应性小于 λ （动态法BET系列中的最低浓度）。

Charles River用于放行无菌微孔板并确认无反应性的筛选程序如下：

- 1.将 λ 随机添加到4个孔中。
- 2.将LRW添加到其余的孔中。
- 3.向所有孔中添加LAL。

如果99%含LRW的孔未能在比含入浓度的孔短的时间内发生反应，则微孔板符合验收标准。

总结

某些塑料配件会污染LAL和释放抑制剂，从而改变CSE在工作标准液中的分散度。我们可以选择不干扰特性的聚丙烯移液器吸头，聚苯乙烯管和聚苯乙烯微孔板。玻璃移液器是LAL重溶的最佳选择。尽管硼硅酸盐玻璃是黄金标准，但我们仍需要确保没有干扰因素的存在。

比起制造商所声明的规格，了解无菌塑料制品的检测方式和程度更为重要。另外，进料控制也很重要。因为塑料是会变化的，所以即使多年来无问题地使用某产品或某品牌的产品也不能保证内毒素检测永远没有问题。

鲎试剂和配套用品

产品系列	产品描述		货号
除热原玻璃移液管	1mL, 铝箔包装	50支/盒	P100
	2mL, 铝箔包装	50支/盒	P200
	5mL, 铝箔包装	50支/盒	P500
	10mL, 铝箔包装	50支/盒	P1000
Eppendorf®移液吸头	2-200uL, 独立包装	100支/包	D200
96孔Endosafe™板*	96孔聚苯乙烯酶标板 (certified to 0.005EU/mL)	50块/盒	M9005
	96孔聚苯乙烯酶标板 (certified to 0.001EU/mL)	50块/盒	M9001

*经组织培养处理。

产品系列	产品描述		货号
内毒素工作标准品 (CSE) <i>E. coli</i>	CSE – 500 ng /支*	6支/盒	E110
		100支/盒	E110
	CSE – 10 ng /支*	6支/盒	E120
		100支/盒	E120
美国国家参考标准品(RSE)	RSE USP/支		E150
CSE稀释套餐*	CXE稀释内毒素检测盒 1 × 10 ng CSE 1 × 60 mL stabilizing solution 1 pack of 11 of 16 100 mm capped tubes		E140
鲎试验用水**	30mL/瓶 (<0.001 EU/mL)	12瓶/盒	W130
	50mL/瓶 (<0.001 EU/mL)	12瓶/盒	W120
	100mL/# (<0.001 EU/mL)	12瓶/盒	W110
	500mL/瓶 (<0.001 EU/mL)	6瓶/盒	W150

**可通过Endosafe™客户门户网站下载对应批次的分析证书。

*配套购买试剂时, 可通过Endosafe™客户门户网站下载对应批次的分析证书。

产品系列	产品	货号
鲎试剂缓冲液*	5 mL 0.25 M Tris 缓冲液	6支/包 BT101
	30 mL 0.1 M Tris 缓冲液	12支/盒 BT103
	5.5 mL 0.1 M Tris 缓冲液	6支/包 BT105
	30 mL 0.05 M Tris 缓冲液	12支/盒 BT106
	4 mL 0.5 M MgSO ₄ , 1 M Tris 缓冲液	6支/包 BC1000
	5.2 mL内毒素特异性缓冲液	6支/包 BG120
	30 mL生物分散剂	12支/盒 BD100
内毒素指示剂**	10,000 EU	12支/盒 EVV10K
		100支/盒 EVV10K
	100,000 EU	12支/盒 EVV100K
		100支/盒 EVV100K
	1 万 EU	每个 EVV1M
	2.5 万 EU	每个 EVV2.5M
	10 万 EU	每个 EVV10M
试管	10×75 mm带盖燧石玻璃试管	T100
	10×75 mm燧石玻璃试管	T200
	13×100 mm硼硅酸玻璃试管	T300
	10×75 mm硼硅酸玻璃试管	T400
	8×75 mm硼硅酸玻璃试管	T500
	18×105 mm硼硅酸玻璃试管	T600
	16×125 mm (12支)	T900
	16×90 mm带盖硼硅酸玻璃试管	TL700
	12×75 mm硼硅酸玻璃试管	TL1000
	10×75 mm带盖硼硅酸玻璃试管	TL1200

*在使用缓冲液之前请联系技术支持人员。其他缓冲液可用于特定的测试需求
**用于干热烘箱验证