

热原检测试剂盒 (MAT 法) 说明书

货号：1502100

使用前请认真完整阅读说明书！

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 预期用途

单核细胞活化反应测定试验（MAT 法）可检测药品和生物制品中的热原-包含内毒素和非内毒素的热原（即引起人发热的细菌、病毒、真菌）等。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 检测原理

MAT 原理主要是依据人体发热机理设计：利用单核细胞或单核细胞系模拟人体，以细菌内毒素标准品为基准，检测并比较由标准品与供试品分别作用于单核细胞或单核细胞系所产生的活化反应，即单核细胞的 toll 样受体（TLR）可识别热原，启动免疫系统反应，以释放的促炎症细胞因子（如 IL-6、IL-1、IL-1 β 、TNF- α ）量来评价供试品中热原污染情况。从细菌内毒素标准曲线得出的内毒素浓度可等效于热原污染物浓度。

■ 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	培养液	PNS003	25 mL × 2 瓶	2-8 °C
	96 孔微孔板（细胞孵育板）	PNK003	96 孔 × 1 块	2-8 °C
	细菌内毒素检查用水	NND072	8 mL × 1 支	2-8 °C
	生物素偶联抗人白介素-6 抗体 (200×)	PNG010	60 μ L × 1 管	2-8 °C, 避光
	链霉亲和素 HRP 复合物(100×)	PNH002	140 μ L × 1 管	2-8 °C, 避光
	稀释液	PNE004	25 mL × 1 瓶	2-8 °C
	浓缩缓冲液（10×）	PNF001	25 mL × 2 瓶	2-8 °C
	TMB 显色液	PND004	12 mL × 1 瓶	2-8 °C, 避光
	终止液	PNI002	6 mL × 1 瓶	2-8 °C
	封板膜	PNK001	3 片	2-8 °C
II	抗人白介素-6 预包被酶标板	PNA019	8 孔 × 12 条	2-8 °C, 避光
	培养液添加剂	PNR005	1.5 mL × 1 管	-18 °C 及以下
	细菌内毒素工作标准品	PNB019	1 支	-18 °C 及以下

※注：MAT 细胞（单核细胞系）属于附赠品（冻存细胞干冰运输）。

■ 规格

96 测试

■ 有效期

规定储存条件下 12 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（含有波长 450nm 和 600nm 的酶标仪，包含但不限于）

➤ MD SpectraMax M2/i3

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 无菌无热原枪头
- 15 mL、50 mL 无菌无热原离心管
- 5 mL、10 mL 无菌无热原移液管
- 无菌无热原玻璃试管
- 50 mL 无菌无热原加样槽
- 超纯水

■ 相关设备

- 台式低速离心机（可放置 96 孔板）
- 恒温水浴锅
- 二氧化碳恒温培养箱
- 生物安全柜（或超净工作台）
- 大容量电动移液器
- 八道可调量程移液器
- 漩涡振荡器
- 超纯水仪
- 微孔板恒温振荡器
- 洗板机
- 液氮罐（储存细胞用）

■ 操作过程

操作基本流程示意图



一、细菌内毒素工作标准品溶液制备

1. 配制 20 EU/mL 细菌内毒素工作标准品溶液: 取出细菌内毒素工作标准品 (浓度见瓶身), 加入适量细菌内毒素检查用水溶解, 涡旋震荡 15 min, 然后使用细菌内毒素检查用水稀释至终浓度为 20 EU/mL。 (**注意:** 复溶后细菌内毒素标准品可进行分装, 于 -18°C 及以下进行保存, 效期为 1 个月。)

2. 稀释细菌内毒素工作标准品溶液: 将培养液作为稀释液对 20 EU/mL 细菌内毒素工作标准品溶液于无菌无热原玻璃试管中进行梯度稀释, 浓度依次为 2.0 EU/mL、1.0 EU/mL、0.6 EU/mL、0.3 EU/mL、0.1 EU/mL、0.05 EU/mL、0.025 EU/mL 和 0.0125 EU/mL, 培养液为阴性对照。 (**注意:** 工作标准品的每一步稀释旋涡震荡至少 1 min。每个浓度设置 4 复孔, 加入 96 孔细胞孵育板中。稀释的各浓度梯度内毒素标准溶液应在 4 h 内用完, 每次加样前需再次旋涡混匀后添加。)

表 1. 细菌内毒素工作标准品溶液的配制

稀释管	稀释步骤	浓度(EU/mL)
ST0	200 μ L 20 EU/mL 内毒素溶液 + 1800 μ L 培养液	2.0
ST1	1200 μ L ST0 + 1200 μ L 培养液	1.0
ST2	1800 μ L ST1 + 1200 μ L 培养液	0.6
ST3	500 μ L ST2 + 500 μ L 培养液	0.3
ST4	400 μ L ST3 + 800 μ L 培养液	0.1
ST5	500 μ L ST4 + 500 μ L 培养液	0.05
ST6	500 μ L ST5 + 500 μ L 培养液	0.025
ST7	500 μ L ST6 + 500 μ L 培养液	0.0125
NCS	培养液	0

(注意: 根据加标浓度可自行调整各浓度配制体积。)

二、待测供试品溶液制备

1. 根据《中华人民共和国药典》确定待测样品所属热原污染物的限值:

供试品的热原污染物限值 (contaminant limit concentration, CLC) 可用内毒素量表示, 按以下公式计算: $CLC = K / M$

CLC: 为供试品的热原污染物限值, 一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示;

K: 为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量, 以 EU/(kg . h)表示, 注射剂 $K = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, 放射性药品注射剂 $K = 2.5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, 鞘内用注射剂 $K = 0.2 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$;

M: 为人用每千克体重的最大供试品剂量, 以 mL/(kg . h)、mg/(kg . h)或 U/(kg . h)表示, 中国人均体重按 60 kg 计算, 人体表面积按 1.62 m² 计算。注射时间若不足 1 小时, 按 1 小时计算。供试品每平方米体表面积剂量乘以 0.027 即可转换为每千克体重剂量(M)。

2. 根据《中华人民共和国药典》确定待测样品的最大有效稀释倍数:

供试品的最大有效稀释倍数 (maximum validation dilution, MVD)是指在试验中供试品溶液被允许稀释的最大倍数, 在不超过此稀释倍数的浓度下进行污染物限值的检测。需用以下公式计算: $MVD = CLC \times c / LOD$

CLC: 为供试品的热原污染物限值, 一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示;

c: 供试品溶液浓度, 当 CLC 以 EU/mL 表示时则 c 等于 1.0 mL/mL, 当 CLC 以 EU/mg 或 EU/U 表示时, c 的单位为 mg/mL 或 U/mL。

LOD (Limit of Detection): 最低检测限, 即所制备的细菌内毒素标准曲线 (S 形四参数拟合曲线) 的最低点浓度, 该检测限所致单核细胞分泌的内热原量应不小于阈值 (阴性对照的平均值加上其 3 倍的标准偏差); 若小于阈值, 则将阈值代入上述四参数拟合曲线中, 获得的浓度值即为最低检测限。

3. 根据《中华人民共和国药典》确定供试品溶液的干扰实验设置:

表 2. 干扰试验溶液的制备

编号	溶液	平行孔数	备注
①	供试品的 A 倍稀释液	4	A 不超过 MVD
②	供试品的 2A 倍稀释液	4	2A 不超过 MVD
③	供试品的 4A 倍稀释液	4	4A 不超过 MVD
④	供试品的 A 倍稀释液 + 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA
⑤	供试品的 2A 倍稀释液 + 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA
⑥	供试品的 4A 倍稀释液 + 标准曲线中点或附近的一个已知浓度内毒素	4	NA

(**注意:** 初次测试样品, 推荐以定量限作为 LOD 计算 MVD。)

4. 供试品溶液的配制:

对供试品 (药品或生物制品等) 建立热原检测法时, 必须进行干扰实验。按以上信息, 将培养液作为稀释液, 配制符合稀释倍数要求的供试品稀释溶液, 以及供试品稀释溶液的加标溶液。(注意: 每一步稀释旋涡震荡至少 1 min, 相邻浓度间稀释倍数不得大于 10。每次加样前需再次旋涡混匀后添加。)

三、细菌内毒素工作标准品及待测供试品溶液的添加

细菌内毒素工作标准品 (至少 5 个浓度梯度) 以及待测供试品稀释溶液配制完成后, 将各样品依次添加入 96 孔细胞孵育板中, 100 μ L/孔, 设置 4 复孔。每次加样前需再次旋涡混匀后添加。

样品检测建议:

表 3. 96 孔板排布示意

96 孔微孔板 (细胞孵育板)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1			样本 1-①				样本 2-①				
B	ST2			样本 1-②				样本 2-②				
C	ST3			样本 1-③				样本 2-③				
D	ST4			样本 1-④				样本 2-④				
E	ST5			样本 1-⑤				样本 2-⑤				
F	ST6			样本 1-⑥				样本 2-⑥				
G	ST7			样本 1-①+NEP (选做)				样本 2-①+NEP (选做)				
H	NCS			NEP (选做) *				NA				

*NEP (选做): Non-Endotoxin Pyrogen (NEP), 为非内毒素热原。

①~⑥对应表 2 中的序号。

四、MAT 单核细胞系悬液的制备及铺板

1. 打开 37 °C 恒温水浴锅预热培养液, 培养液添加剂室温平衡。
2. 从液氮罐中取出 2 支 MAT 细胞 (此为 96 孔板全板细胞使用量), 低温条件下快速转移至水浴锅。
3. 37 °C 水浴快速融化细胞, 待细胞完全融化时, 用 75% 酒精喷洒冻存管消毒并擦干管表面水分, 在生物安全柜中进行后续操作。(注意: 可用消毒镊子夹好细胞, 在水浴中轻轻晃动, 避免水浸过冻存管盖。)
4. 准备一只干净的 50 mL 离心管, 加入 17 mL 培养液和 305 μ L 培养液添加剂, 再将上述步骤 3 融化的细胞转入, 充分吹打混匀避免细胞结团。

注意: 如果步骤 2 取出的 MAT 细胞数量为 1 支时, 培养液和培养液添加剂加入体积均应减半。

五、MAT 单核细胞系活化反应

配制好的单核细胞系悬液转入无菌加样槽, 用 8 通道手动排枪, 吹打混匀后依次将细胞悬液按 150 μ L/孔加入到步骤三的 96 孔细胞孵育板中, 37 °C, 5% CO₂ 孵育 24h。

六、IL-6 ELISA 检测

(一) 实验前准备

1. 取出预包被酶标板, 于室温平衡约 20 min。其余试剂在使用前均需提前取出, 于室温平衡; 在使用后立即放回 2-8 °C 保存。

2. 根据检测样品数量计算所需孔数, 取出相应数量的预包被酶标板条, 剩余板条连同干燥剂置于自封袋中密封, 放回试剂盒中, 保存在 2-8 °C 冰箱, 于效期内 (打开后效期: 90 天) 使用完。

备注: 室温指 25 °C ± 3 °C。

(二) 试剂配制

1. 1×缓冲液配制: 浓缩缓冲液 (10×) 用超纯水稀释 10 倍, 例如取 25 mL 浓缩缓冲液 (10×) 加入 225 mL 超纯水混匀, 即为 1×缓冲液, 用于洗板。建议现配现用。

备注: 取出浓缩缓冲液 (10×) 和稀释液观察, 如有结晶属正常现象, 于 37 °C 温育直至完全溶解。

2. 1×生物素偶联抗人白介素-6 抗体溶液配制: 用稀释液于无菌离心管中将生物素偶联抗人白介素-6 抗体 (200×) 稀释 200 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×生物素偶联抗人白介素-6 抗体溶液。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。配制后当天使用。
3. 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液配制: 用稀释液于无菌离心管中将链霉亲和素 HRP 复合物 (100×) 稀释 100 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。配制后当天使用。

(三) 孵育: 校准品及待测样品

1. 细胞培养物上清收集: 96 孔细胞孵育板孵育 24 h 后取出, 2000 g, 室温离心 10 min, 以清除碎片。(注意: 离心时配平, 切勿让细胞板倾斜泄漏液体。)
2. 准确移取 50 μL 细胞培养物上清加入相应微孔板中 (使用 8 通道手动排枪)。
3. 加样完毕后将微孔板用封板膜密封, 放置于微孔板恒温振荡器上, 室温条件下 600 rpm, 避光振荡孵育 1 h。

(四) 孵育: 1×生物素偶联抗人白介素-6 抗体

1. 倒去反应液, 用 1×缓冲液洗板, 300 μL/孔, 浸泡 30 s, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作, 不可放置。本步骤也可由洗板机完成。

2. 准确移取 100 μL 1 \times 生物素偶联抗人白介素-6 抗体溶液至上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。封板膜密封后, 于室温静置孵育 45 min。

(五) 孵育: 1 \times 链霉亲和素 HRP 复合物

1. 倒去反应液, 用 1 \times 缓冲液洗板, 300 μL /孔, 浸泡 30 s, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作, 不可放置。本步骤也可由洗板机完成。
2. 准确移取 100 μL 1 \times 链霉亲和素 HRP 复合物溶液至上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。封板膜密封后, 于室温静置孵育 30 min。

(六) 显色

1. 提前 20 min 将 TMB 显色液置于室温条件下平衡。
2. 倒去反应液, 用 1 \times 缓冲液洗板, 300 μL /孔, 浸泡 30 s, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干。重复 5 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作, 不可放置。本步骤也可由洗板机完成。
3. 准确移取 100 μL TMB 显色液至上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。于室温避光静置孵育 3-10 min。此步骤勿用封板膜密封。(注意: 加入 TMB 后, 孔内颜色逐渐变蓝并随反应时间增长而加深, 当标准品蓝色呈现梯度变化时即可加入终止液, 待加入终止液后, 颜色由蓝色变为黄色, 信号强度增强约 3 倍。为避免信号饱和, 也可在终止前检测标准品的高浓度 $\text{OD}_{600\text{nm}}$, 其达到 1.0 左右时进行下一步操作。)

(七) 终止

1. 准确移取 50 μL 终止液至上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。

(八) 读数

1. 测定前震荡 30s 混匀, 设定酶标仪波长 450 nm, 测定各孔 OD 值。测定不可覆盖封板膜或盖子。读板应于终止完成后 10 min 内完成。

■ 数据处理

根据不同浓度梯度的细菌内毒素工作标准品测定的吸光值 $\text{OD}_{450\text{nm}}$, 建立四参数拟合标准曲线: $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$, 其中: Y 为 OD, X 为内毒素的浓度, A 为曲线上渐近线估值, D 为曲线下渐近线估值, B 为曲线的斜率, C 为最大结合一半时对应的剂量。(标曲要求: 标准曲线的浓度点 ≥ 4 , 线性相关系数 $R^2 \geq 0.980$)

将测定的各供试品稀释溶液吸光值 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 代入标准曲线, 计算对应的内毒素浓度, 并计算样品回收率。

供试品稀释溶液中内毒素的回收率 R:

$$R = (C_{\text{加标后}} - C_{\text{加标前}}) / C_{\text{加入的内毒素标准品}} \times 100\%$$

根据《中华人民共和国药典》要求, 在建立一个品种 MAT 法时, 须先进行细菌内毒素加样回收干扰实验, 当内毒素回收率在 50% - 200% 之间, 则认为此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。当内毒素回收率在 50% - 200% 之外, 需对供试品再次稀释或进行其它处理消除干扰, 直到内毒素的回收率在 50% - 200% 之间。

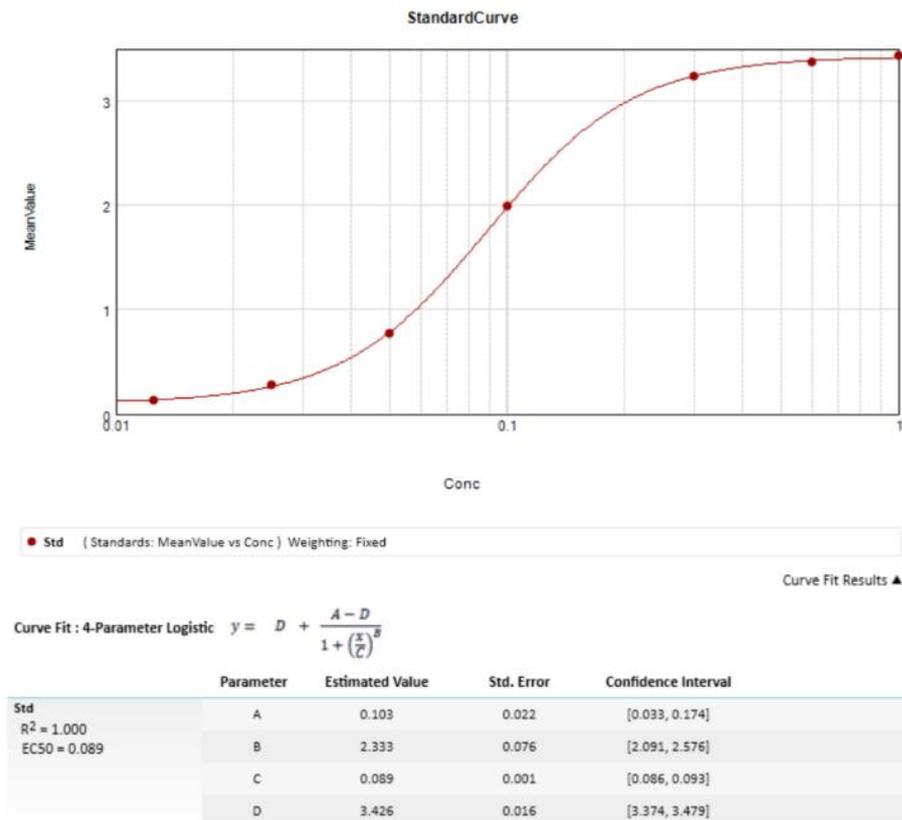


图 1. 细菌内毒素工作标准品标准曲线图 (示例)

■ 结果判断

如供试品溶液①、②、③的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后, 均小于规定的限值(CLC), 则判供试品符合规定, 否则判供试品不符合规定。

■ 产品性能指标 (用户可根据实际样品法规要求制定相应指标)

1. 标曲拟合范围: 0.0125~1.0 EU/mL (浓度点≥4), 相关系数 R²≥0.980;
2. 定量下限 LLOQ: 0.025 EU/mL;
3. 最低检测限 (LOD): 0.0125 EU/mL (注意: 实际每次检测需要根据标准曲线及药典要求计算)。

■ 注意事项

1. 该试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断, 严禁试剂以任何途径进入人体;
2. 实验操作过程应严格规范, 穿戴好实验防护服、口罩、手套及头套, 并保持实验环境的干净整洁;
3. 本试剂盒实验操作涉及所有实验材料及耗材均需保持无菌无热原;
4. 细菌内毒素工作标准品及供试品的稀释, 必须使用无内毒素玻璃试管完成, 切勿使用塑料管和 EP 管等, 按实验要求严格保证每一步的稀释振荡时间足够;
5. 培养液需要提前 37°C 预热, 培养液添加剂需提前室温解冻;
6. IL-6 检测前, 需提前将试剂盒各组分平衡至室温, 试剂需现配现用;
7. 本法不适用于本身能刺激或抑制单核细胞系促炎症因子的释放以及对细胞增殖有明显影响的供试品。

■ 参考文献

1. 《中华人民共和国药典》(通则 9301), 单核细胞活化反应测定
2. EP<2.6.30> Monocyte activation test

修订日期: 2024 年 09 月 18 日

生效日期: 2024 年 09 月 25 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 400-878-2189