

Bioendo™ rFC Набор для проведения флуориметрического анализа с рекомбинантным фактором С

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР

RFC96TS, RFC96T

Внимание: Bioendo™ rFC Набор для проведения флуориметрического анализа с рекомбинантным фактором С рассчитан на проведение 96 определений.

НАЗНАЧЕНИЕ

Bioendo™ rFC Набор для проведения флуориметрического анализа с рекомбинантным фактором С предназначен для количественного определения In Vitro эндотоксинов грамотрицательных бактерий (липополисахаридов) с помощью рекомбинантного фактора С.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Только для определения эндотоксинов In Vitro. Не использовать для определения эндотоксемии у человека.

ПРИНЦИПЫ

Фактор С амебоцитов мечехвоста является первым ферментом в каталитическом каскаде сериновых протеаз, запускаемом эндотоксинами в амебоцитах мечехвоста. В данном наборе использована рекомбинантная технология экспрессии фактора С амебоцитов мечехвоста Tachypleus в эукариотических клетках. После активации рекомбинантного фактора С эндотоксинами он трансформируется из неактивной протеасомы в биоактивную протеазу, которая распознает и катализирует флуоресцентный субстрат, при этом генерируется флуоресцентный сигнал. Интенсивность флуоресцентного сигнала положительно коррелирует с концентрацией эндотоксина. Концентрация эндотоксинов в образце рассчитывается по стандартной кривой.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Набор для проведения флуориметрического анализа с рекомбинантным фактором С хранится при температуре 2-8°C.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Рекомбинантный фактор С

Каталожный номер RFC48TS или RFC48T, флакон с синей этикеткой

Два флакона лиофилизированного рекомбинантного фактора С (rFC), 2,5 мл во флаконе. rFC лиофилизирован вместе с флуорогенным субстратом. На флаконе с лизатом не указана конкретная чувствительность. Чувствительность в каждом анализе (обозначаемая λ) – это наименьшая концентрация эндотоксина, используемая для построения стандартной кривой. Для набора RFC96TS максимальная чувствительность в анализе λ составляет 0,005 ЕЭ/мл; для набора RFC96T максимальная чувствительность λ составляет 0,01 ЕЭ/мл. Каждый флакон рассчитан на постановку 48 определений.

Рекомендуется хранение при температуре 2-8 °С. Избегайте воздействия в течение длительного времени температуры выше 25°C или яркого света.

Растворенный рекомбинантный фактор С можно хранить при температуре 2-8°C в течение 48 часов или при температуре -20°C в течение одного месяца, допускается только однократное размораживание.

2. Буфер для разведения

Каталожный номер RFCRB48T, флакон с зеленой этикеткой

Два флакона с буфером для разведения, 3,0 мл во флаконе. Буфер используется для растворения лиофилизированного рекомбинантного фактора С. Буфер для разведения следует хранить при температуре 2-8°C.

3. Вода для БЭТ

Каталожный номер TRW50, флакон с серой этикеткой

Один флакон воды для БЭТ, 50 мл. Содержание эндотоксинов в воде для БЭТ составляет менее 0,003 ЕЭ/мл. Вода для БЭТ используется для растворения КСЭ, для разведения стандартов эндотоксина и испытуемых образцов, а также как отрицательный контроль (blank). Вода для БЭТ должна храниться при температуре 2-30°C.

4. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)

Каталожный номер CSE10V, флакон с красной этикеткой

Два флакона контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), бактериальный штамм *E. coli* O111:B4. Каждый флакон содержит 10-50 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в сертификате анализа. Хранить при температуре 2-8°C.

Растворите КСЭ с помощью воды для БЭТ. Объем для растворения указан в сертификате анализа. Интенсивно перемешайте в течение 5 минут на вихревой мешалке. Раствор КСЭ с активностью менее 20 ЕЭ/мл стабилен в течение одного дня при температуре 2-8°C, раствор КСЭ с активностью равной или выше 20 ЕЭ/мл, стабилен не менее одной недели при температуре 2-8°C. Не замораживайте раствор эндотоксина.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Апиrogenные пипетки на 1,0 мл и 100 мкл или автоматические дозаторы с апиrogenными наконечниками.
2. Апиrogenные черные стрипы для флуоресцентного анализа на эндотоксины (Каталожный номер MRF96 или эквивалент). (Поставляются с набором).
3. Апиrogenные стеклянные пробирки для разведений для разведения стандартов эндотоксина и образцов (Каталожный номер T1310030, T1310005, T1310005C или эквивалент).
4. Штатив для пробирок.
5. Таймер.
6. Вортекс.
7. Инкубационный флуоресцентный микропланшетный ридер, рекомендуемая модель H1F-SN производства Agilent Technologies, Inc с фильтрами возбуждения при длине волны 380 нм/излучения при длине волны 440 нм и программным обеспечением Gen5.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Вся стеклянная посуда, пластик и растворители, контактирующие с образцами или реактивами, должны быть свободными от эндотоксинов. Стеклянная посуда и другие термоустойчивые материалы могут быть депиrogenизированы в сухожаровом шкафу с

использованием валидированного процесса, обычно используемые минимальное время и температура составляют 60 минут при 250 °С.

Следует использовать технику асептической работы на всем протяжении анализа.

Испытуемые образцы должны храниться в условиях, при которых остановлена вся бактериологическая активность. Образцы следует хранить при температуре 2-8°С не более 24 часов или при температуре ниже -10°С в течение более длительного времени.

Оптимальный диапазон рН для реакционной смеси составляет от 6.0 до 8.0. Кислые или щелочные образцы могут быть доведены до желаемого значения рН с помощью апиrogenных 0.1N растворов натрия гидроксида или хлороводородной кислоты или апиrogenного трис-буфера.

Всегда измеряйте рН аликвоты отдельного раствора образца, чтобы избежать контаминации рН-электродом.

Препарат следует проверить на возможность ингибирования, в случае необходимости ингибирование должно быть преодолено как описано в разделе **ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА.**

ПОДГОТОВКА СТАНДАРТОВ ЭНДОТОКСИНА

Растворите контрольный стандарт эндотоксина с помощью 1 мл воды для БЭТ, интенсивно перемешайте на вортеске не менее 5 минут для получения исходного раствора контрольного стандарта эндотоксина. Для наборов с каталожным номером RFC96TS предлагаемый диапазон калибровочной кривой составляет 0,005-5 ЕЭ/мл. Следует подготовить растворы стандарта эндотоксина с концентрациями 0,005 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 5 ЕЭ/мл. В следующем примере используется исходный раствор контрольного стандарта эндотоксина с концентрацией 20 ЕЭ/мл:

1. Смешайте 0,5 мл раствора КСЭ с концентрацией 20 ЕЭ/мл и 1,5 мл воды для БЭТ в апиrogenной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 5 ЕЭ/мл.
2. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 5 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апиrogenной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл.
3. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апиrogenной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл.
4. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апиrogenной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 0,005 ЕЭ/мл.
5. Оставшиеся разведения эндотоксина следует выбросить спустя 4 часа.

Для наборов с каталожным номером RFC96Т предлагаемый диапазон калибровочной кривой составляет 0,01-10 ЕЭ/мл. Следует подготовить растворы стандарта эндотоксина с концентрациями 0,01 ЕЭ/мл, 0,1 ЕЭ/мл, 1 ЕЭ/мл и 10 ЕЭ/мл. В следующем примере используется исходный раствор контрольного стандарта эндотоксина с концентрацией 20 ЕЭ/мл:

1. Смешайте 0,5 мл раствора КСЭ с концентрацией 20 ЕЭ/мл и 0,5 мл воды для БЭТ в апирогенной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 10 ЕЭ/мл.
2. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 10 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апирогенной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 1 ЕЭ/мл.
3. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 1 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апирогенной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл.
4. Смешайте 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл и 0,9 мл воды для БЭТ в апирогенной пробирке, перемешайте на вортеске в течение 1 минуты для получения раствора с концентрацией 0,01 ЕЭ/мл.
5. Оставшиеся разведения эндотоксина следует выбросить спустя 4 часа.

УСТАНОВКА ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МИКРОПЛАНШЕТНОГО РИДЕРА

1. Установите температуру инкубатора на 37°C.
2. Установите скорость перемешивания планшета перед считыванием как среднюю в течение 15 секунд.
3. Установите длину волны: если используется флуоресцентный микропланшетный ридер H1F-SN, рекомендуется использовать длину волны возбуждения 380 нм/излучения 440 нм. Пример установки параметров ридера приведен ниже:

	H1F-SN
Time between readings (hh:mm:ss)	00:T:00 (см. сертификат анализа)
Excitation filter(nm)	380:20
Emission filter(nm)	440:30
Scans per well	10
Delay before scanning (miliseconds)	200
Optics position	top
Sensitivity	25, 27, 29 (выбрать после проверки)

4. Установка чувствительности для флуоресцентного ридера
Перед анализом необходимо установить чувствительность флуоресцентного ридера таким образом, чтобы флуоресцентный сигнал попадал в нужный диапазон для того, чтобы диапазон определения стандартной кривой был оптимизирован. Если будет установлена слишком низкая чувствительность, то флуоресцентный сигнал для точки с самой низкой концентрацией эндотоксина в стандартной кривой будет очень слабым, в результате чего будет сложно разделить данные для наименьшей точки стандартной кривой и отрицательного контроля. Если будет установлена слишком высокая чувствительность, то флуоресцентный сигнал для точки с самой высокой концентрацией эндотоксина в стандартной кривой будет слишком сильным, что превысит диапазон определения. Обычно флуоресцентный сигнал выражается в Относительных Единицах Флуоресценции (RFU). Рекомендуется настроить чистое значение Δ RFU (значение RFU для времени T минус значение RFU для нулевого времени, скорректированное по отрицательному контролю blank), которое должно быть в районе значения 3000 (диапазон от 2000 до 4500) для точки стандартной кривой с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл. Пользователи могут настроить

чувствительность флуоресцентного ридера путем настройки коэффициента усиления. В примере с ридером H1F-SN во время начального определения чувствительности для анализа следует установить несколько значений коэффициента усиления (рекомендуемые значения коэффициента усиления – 25, 27 и 29), при этом должна быть определена каждая концентрация стандартной кривой. В качестве значения коэффициента усиления для каждой серии реактивов следует выбрать то значение, при котором чистое значение ΔRFU попадает в район 3000 для точки с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл, а коэффициент корреляции для стандартной кривой наиболее близок к 1.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Начинайте выполнение анализа, когда температура инкубатора флуоресцентного микропланшетного ридера достигнет 37°C.
2. Анализ проводится в двух или трех повторностях.
3. Перемешайте растворы стандартов эндотоксина и образцов перед внесением на планшет. Поместите черные апириогенные стрипы для микропланшета в держатель для стрипов.
4. Внесите по 100 мкл воды для БЭТ (в качестве отрицательного контроля), растворов стандартов эндотоксина и испытуемых образцов в соответствующие лунки планшета. Избегайте образования пузырей.
5. После этого предварительно прогрейте планшет в течение 10 минут в инкубаторе микропланшетного ридера.
6. Во время преинкубирования планшета растворите каждый флакон с рекомбинантным фактором С и флуорогенным субстратом с помощью 2,5 мл **буфера для разведения**. Осторожно перемешайте флакон плавным покачиванием и покручиванием до полного растворения содержимого флакона. Не используйте вихревую мешалку. Раствор рекомбинантного фактора С может храниться при температуре 2-8°C в течение 48 часов или при температуре -20°C в течение месяца, допускается только однократная разморозка. Если требуется более одного флакона, объедините два или более флаконов перед использованием.
7. После завершения преинкубирования достаньте планшет, быстро внесите по 50 мкл раствора рекомбинантного фактора С в каждую лунку планшета. Избегайте воздушных пузырей. Оставьте планшет без крышки.
8. Поместите планшет во флуоресцентный микропланшетный ридер.
9. Запустите программу считывания данных. Программа должна включать перед началом считывания встряхивание планшета на средней скорости в течение 15 секунд для того, чтобы тщательно перемешать rFC и испытуемый образец.
10. После того, как перемешивание закончится, выполните считывание при нулевом времени.
11. Инкубируйте реакционные смеси в течение времени Т и выполните считывание после истечения времени Т.

СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

1. Запишите значения RFU нулевого времени и времени Т.
2. Разница между значениями во время Т и в нулевое время является ΔRFU .
3. Значения ΔRFU скорректированы с бланком для получения чистого значения ΔRFU

(net Δ RFU).

4. Следующее уравнение описывает линейную зависимость логарифмов чистого значения Δ RFU (net Δ RFU) от логарифмов значения концентрации эндотоксина:

Уравнение стандартной кривой:

$$\log_{10}(Y) = B * \log_{10}X + A,$$

где Y = net Δ RFU (RFU во время T минус RFU в нулевое время, скорректированное с отрицательным контролем), X=концентрация эндотоксина,

B= наклон регрессионной кривой, A = точка пересечения с осью Y.

НАЧАЛЬНАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ

По требованиям Фармакопеи при изменении условий, которые могут повлиять на результаты анализа, должна быть проведена валидация.

1. Валидация стандартной кривой

При получении новой партии рекомбинантного фактора С должен быть проведен анализ валидации стандартной кривой. Приготовьте как минимум три концентрации стандарта эндотоксина в пределах диапазона калибровочной кривой, указанного в сертификате анализа. Проведите анализ минимум в трех повторностях для каждой концентрации эндотоксина. В отличие от **РУТИННЫХ ИСПЫТАНИЙ** не усредняйте значения поглощения для повторностей. Абсолютное значение коэффициента корреляции, r, для выбранного диапазона концентраций эндотоксина должно быть равно или более 0,980.

2. Анализ на мешающие факторы

Анализ на мешающие факторы должен проводиться при изменении условий, которые могут повлиять на результаты анализа. Это включает, но не ограничивается, изменение состава испытуемого образца или изменение поставщика рекомбинантного фактора С. Обратитесь к разделу **ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА**.

ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА

Если есть подозрение на то, что испытуемый препарат содержит мешающие факторы, необходимо провести тест на оценку ингибирования. Подготовьте положительный контроль препарата (PPC). PPC – это раствор испытуемого препарата, к которому добавлено известное количество эндотоксина (спайк). Концентрация эндотоксина в спайке (λm) должна быть в середине диапазона калибровочной кривой.

1. Проведите анализ образцов со спайком (PPC) и без спайка.
2. Определите концентрацию эндотоксина в образцах со спайком (C_s) и в образцах без спайка (C_t).
3. Рассчитайте коэффициент восстановления - recovery (R): $R = (C_s - C_t) / \lambda m \times 100\%$.
4. Если коэффициент восстановления находится в диапазоне от 50% до 200%, это означает незначительное ингибирование. Если коэффициент восстановления выходит за пределы диапазона 50% - 200%, это означает значительное ингибирование.
Для уменьшения ингибирования до незначительного уровня обычно используются разведение или модификация.
5. Если значение R находится за пределами диапазона 50% - 200%, следует повторить тест на ингибирование в серии разведений препарата (разведения не должны превышать Максимально допустимое разведение).

6. Для проведения рутинных испытаний лучше выбрать такой фактор разведения препарата, для которого значение R будет наиболее близко к 100%.

РУТИННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для проведения рутинных испытаний подготовьте серию стандартов эндотоксина и проведите анализ стандартов эндотоксина и неизвестных образцов в одно и то же время и в одинаковых условиях. Рассчитайте концентрацию эндотоксина в неизвестных образцах путем сравнения с результатами для стандартной кривой. Каждая концентрация стандарта и неизвестные образцы должны проверяться как минимум в двух повторностях. При расчетах усредните значения поглощения. Пользователь может включить положительный контроль препарата (PPC) в качестве мониторинга ингибирования или усиления реакции препаратом.

КРИТЕРИИ АНАЛИЗА

Анализ считается достоверным только при полном соблюдении следующих требований:

1. Для построения стандартной кривой используется как минимум три концентрации эндотоксина и отрицательный контроль. Каждая концентрация эндотоксина проверяется как минимум в трех повторностях.
2. Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) для рассчитанной стандартной кривой должно быть ≥ 0.980 .
3. Значения ΔRFU (RFU во время T минус RFU в нулевое время) для самой низкой концентрации эндотоксина в стандартной кривой должны быть больше, чем значения ΔRFU для отрицательных контролей.
4. Коэффициент вариации ($C.V.$) равен стандартному отклонению чистого значения ΔRFU (RFU вовремя T минус RFU в нулевое время, скорректированное по отрицательному контролю) деленному на среднее значение и выражается в процентах. Значение коэффициента вариации $\%C.V.$ чистого значения ΔRFU для повторностей должно быть менее или равно 20%.

ССЫЛКИ

1. Williams KL. Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation. In: Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Taylor & Francis, London, UK (2001).
2. Pearson FC 3rd, Weary ME, Dabbah R. A corporate approach to in-process and end-product testing with the LAL assay for endotoxin. Prog. Clin. Biol. Res. 93, 231–246 (1982).
3. Peavy DL, Shands JW Jr, Adler WH, Smith RT. Mitogenicity of bacterial endotoxins: characterization of the mitogenic principle. J. Immunol. 111(2), 352–357 (1973).
4. Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes. Isolation and characterization. Eur. J. Biochem. 154(3), 511–521 (1986).
5. Loverock B, Simon B, Burgenson A, Baines A. A recombinant Factor C procedure for the detection of Gram-negative bacterial endotoxin. US Pharmacopeial Forum 35, 1613–1621 (2009).
6. Ding JL, Chai C, Pui AWM et al. Expression of full length and deletion homologues of Carcinoscorpius rotundicauda Factor C in Saccharomyces cerevisiae: immunoreactivity and endotoxin binding. J. Endotoxin Res. 4, 33–43 (1997).
7. Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.