

通则 体外热原检查法（报告基因法）

本法系依据表达热原相关受体的转基因细胞受热原（如革兰氏阴性菌来源的内毒素，革兰氏阳性菌来源的脂壁酸，酵母来源的酵母多糖等）刺激后，产生的相关热原标志物的信号量与热原浓度呈一定的量效关系，通过检测并比较标准品与供试品作用于转基因细胞所产生的相关热原标志物的信号量，定量或定性检测供试品中的热原含量。

本法可作为热原检查的补充方法，操作过程应防止微生物和热原的污染。本法不适用于本身能刺激或抑制热原标志物（如NF- κ B）活化的供试品。

实验材料

转基因细胞 可采用 THP-1/NF- κ B、HL60/NF- κ B 或其它适宜的转基因细胞。转基因细胞的构建及质量应符合中国药典《基于基因修饰细胞系的生物检定法指导原则》（拟增）和《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制》的要求。建立的转基因细胞其热原相关受体（如 Tol1 样受体 2, 4, 6）应表达丰富，且具有相应的稳定性。转基因细胞稳定性研究应至少包括细胞倍增时间、药物刺激后细胞产生的最大信号响应值、信噪比和受体（如 Tol1 样受体 2, 4, 6）表达情况等内容。

试剂 根据转基因细胞及建立并验证的方法选择适宜的细胞培养液、维持培养液和显色剂。

试验所用的所有耗材均须无热原污染。耐热器皿常用干热灭菌法（250℃、30 分钟以上），也可采用其他确证不干扰热原检查的适宜方法去除热原。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无热原并对试验无干扰的器具。

热原污染物限值的确定

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：

$$CLC=K/M$$

式中 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 $K=5EU/(kg·h)$ ，放射性药品注射剂 $K=2.5EU/(kg·h)$ ，鞘内用注射剂

$K=0.2EU/(kg \cdot h)$ 。

M 为人用每千克体重的最大供试品剂量，以 $ml/(kg \cdot h)$ 、 $mg/(kg \cdot h)$ 或 $U/(kg \cdot h)$ 表示，中国人均体重按 $60kg$ 计算，人体表面积按 $1.62m^2$ 计算。注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计算。

确定最大有效稀释倍数

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。用以下公式计算 MVD:

$$MVD=CLC \times C/LOD$$

式中 CLC 为供试品的热原污染物限值;

C 为供试品溶液浓度，当 CLC 以 EU/ml 表示时，则 C 等于 $1.0ml/ml$ ，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)为最低检测限，即所制备标准曲线的最低浓度，该检测限所至信号值应不小于阈值（阴性对照的平均值加上其 3 倍的标准偏差）；若小于阈值，则将阈值代入标准曲线中，获得的浓度值即为最低检测限。

溶液的配制

按表 1 制备标准品、供试品溶液。取细菌内毒素标准品作为本法的标准品。将细菌内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解，在旋涡混合器上混匀 15 分钟或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作。然后用维持培养液制成所需内毒素浓度的标准品溶液，每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 秒，将此系列溶液作为标准品溶液。

表 1 体外热原检查法（报告基因法）溶液的制备

编号	溶液	内毒素含量(EU/ml)	平行孔数 (n)
A	供试品溶液	无	4
B	供试品溶液/2	无	4
C	供试品溶液/4	无	4
D	供试品溶液	取标准曲线的中点 (或附近点) 的浓度	4
E	供试品溶液/2	标准曲线的中点 (或	4

		附近点) 的浓度	
F	供试品溶液/4	标准曲线的中点 (或 附近点) 的浓度	4
R ₀	维持培养液	无	4
R ₁ ~ R _n	标准品溶液	不少于 4 个浓度的标 准品溶液	4

注: A 为稀释倍数不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的供试品溶液 (如内毒素回收率在 50~200% 之间的最大浓度供试品溶液)。

B 为溶液 A 的 2 倍稀释液, 不能超过供试品的 MVD。

C 为溶液 A 的 4 倍稀释液, 不能超过供试品的 MVD。

D 为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知浓度内毒素, 且与溶液 A 有相同稀释倍数的供试品溶液。

E 为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知浓度内毒素, 且与溶液 B 有相同稀释倍数的供试品溶液。

F 为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知浓度内毒素, 且与溶液 C 有相同稀释倍数的供试品溶液。

R₀ 为阴性对照。

R₁ ~ R_n 为各浓度标准品溶液 (n ≥ 4)。

供试品干扰试验

首次应用本法进行供试品热原检测时, 须进行供试品干扰试验; 当供试品的处方、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时, 须重新进行供试品的干扰试验。

按表 1 配制干扰试验供试品溶液 (溶液 D-F), 按检查法项下进行试验, 将干扰试验供试品溶液 (溶液 D-F) 测得的内毒素值 (C_{D-F}), 供试品溶液 (溶液 A-C) 测得内毒素值 (C_{A-C}), 带入下式, 计算本试验条件下内毒素回收率 (R)。

$$R = (C_{D-F} - C_{A-C}) \div \text{加入的内毒素浓度} \times 100\%$$

当供试品在不大于 MVD 的至少一个稀释倍数下的回收率在 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。使用本法前, 要求采用该品种至少 3 批供试品进行干扰试验。当该品种在不大于 MVD 的稀释倍数下不

干扰时（包括采用某种方法能消除干扰），可采用本法进行热原测定。

检查法

因不同报告基因法的试验参数不同，应在试验前建立测定法并加以验证。转基因细胞用细胞培养液于 37℃，5%二氧化碳条件下培养，取生长状态良好的细胞用于试验。无菌条件下，用维持培养液制备适宜浓度的细胞悬液，接种于 96 孔板。加入不同浓度标准品溶液、供试品溶液，每个浓度均设 4 个复孔，阴性对照（至少设 4 个复孔）加入维持培养液，置 37℃，5%二氧化碳条件下培养适宜时间后，每孔加入显色剂。具体试验参数（如加入的细胞悬液、标准品或供试品溶液和显色剂的浓度、体积，标准品或供试品溶液作用转基因细胞的时间，加入显色剂显色的时间等）均应根据所建立的方法确定。

以标准品溶液浓度为横坐标，相应的信号值为纵坐标，根据验证建立的方法，确定适宜的拟合模型拟合标准曲线。将供试品溶液测得的信号值带入标准曲线中，计算供试品溶液热原含量。

试验必须符合以下条件方为有效：

(1) 标准曲线剂量与反应值（必要时可进行适当的数据转换）的回归应有显著差异 ($p < 0.01$)；对数剂量与反应值的回归不得显著偏离直线 ($p > 0.05$)，若用四参数拟合，所得曲线不得显著偏离理论曲线。

(2) 标准曲线决定系数 (R^2) 应不低于 0.95；

(3) 检测限应不大于 0.5EU/ml；

(4) 不大于 MVD 的至少一个稀释倍数下的供试品干扰试验热原回收率须在 50%~200%范围内。

结果判断

供试品溶液 A、B、C 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)，则供试品符合规定，否则判供试品不符合规定。

起草单位：中国食品药品检定研究院
上海市食品药品检验研究院

联系方式：010—53851580
021—50798176