

纳入中国药典的 体外热原检测方法学（报告基因法）

什么是热原？

热原 (Pyrogen) 是指能引起人体或其他恒温动物发热反应的物质，主要包括细菌内毒素 (LPS) 和非内毒素热原 (如脂磷壁酸、细菌脂蛋白、真菌成分以及病毒成分等)。热原污染是注射剂、疫苗、生物制品等药品生产中的重大安全隐患，可导致发热、休克甚至死亡等严重不良反应。

为什么要做热原检测？

各国药典均要求对注射剂、生物制品、疫苗、医疗器械等进行热原检测，以确保产品安全性。热原检测是药品质量控制的关键环节，贯穿于原料、生产过程和成品检验全流程。

常规检测方法及其局限性

- **家兔法 (RPT)**：需要大量实验动物，操作复杂，灵敏度较低，不符合 3R 原则
- **鲎试剂法 (LAL/BET)**：只能检测内毒素，无法检测非内毒素热原 (如脂磷壁酸、真菌成分等)
- **单核细胞活化试验 (MAT)**：可检测内毒素和非内毒素热原，但依赖 ELISA 检测，流程复杂、耗时长

报告基因法 —— 纳入中国药典的新方法

报告基因法是基于单核细胞活化试验 (MAT) 原理的新一代热原检测方法，已被纳入《中国药典》2025 版。该方法利用萤光素酶报告基因标记的单核细胞，当热原激活 NF- κ B 信号通路时，萤光素酶表达量增加，通过检测发光信号即可定量热原水平。

优势

- 可同时检测内毒素和非内毒素热原
- 光信号更强，灵敏度更高
- 无需实验动物
- 均质法操作，流程简单
- 仅需普通的发光检测仪即可
- 适用于高通量筛查

Promega —— 提供完整的报告基因法热原检测解决方案

Promega 作为萤光素酶报告基因领域的全球领导者，拥有超过 30 年技术积累，提供业界最全面的萤光素酶产品组合。针对热原检测，Promega 提供两大解决方案：

1

即用型解决方案

可直接购买 Promega 已构建好的、经过预验证的 Bioassay 细胞系。

- TLR Reporter Bioassay 细胞系
- Bio-Glo-NL™ 检测试剂

特点：结果可靠，流程简单，快速开展热原检测

2

自构建解决方案

提供全套工具，支持客户灵活构建自己的检测体系。

- 萤光素酶报告基因载体
- 高效低毒转染试剂
- 单 / 双报告基因检测试剂

特点：灵活选择萤光素酶种类，最大化满足自身需求

1. 即用型解决方案

即用型解决方案专为希望快速开展热原检测、无需自行构建细胞系的实验室而设计。Promega 提供经过预验证的 TLR Bioassay 成品细胞系，操作流程简单，批间一致性好、结果可靠，大幅缩短实验时间，同时降低方法开发与验证的风险。

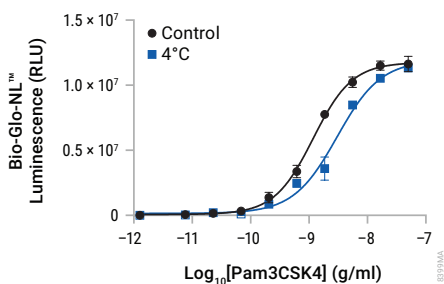
• 什么是 TLR ?

- **识别机制:** 免疫系统通过模式识别受体 (PRRs) 识别 DAMPs 和 PAMPs。
- **TLR 家族:** 作为关键 PRRs, 人类共有 10 种功能性 TLR, 分为质膜型和内体型。
- **信号通路:** MyD88 途径 (除 TLR3 外) 激活 NF- κ B 和 MAPK/AP-1, 产生促炎细胞因子; TRIF 途径 (TLR3/TLR4) 激活 IRF3 并参与 NF- κ B 转录反应, 诱导 I 型干扰素。
- **检测意义:** NF- κ B 位于多条炎症通路下游, 是热原诱导免疫激活的重要功能性读出指标, 已有基于 NF- κ B 报告基因的热原检测方法。

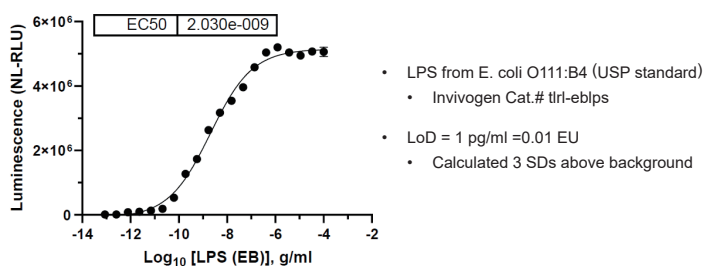
• TLR Reporter Bioassay 工作原理

一款基于生物发光报告基因细胞的检测试剂盒, 克服了现有方法的局限性。该生物测定简单易用、可定量, 用于衡量 TLR 激动剂或抑制剂效力。该检测系统使用一种基因工程细胞系 TLR Bioassay Cells: 内源性表达 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7 和 TLR8 的单核细胞, 具有由 TLR 通路依赖性反应元件驱动的稳定整合的 NanoLuc® (NL) 萤光素酶报告基因。

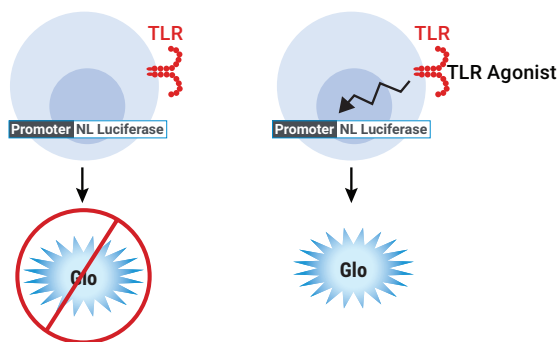
• TLR Reporter Bioassay 数据展示



上图.TLR Bioassay 具有稳定性指示特性。将 TLR1/2 激动剂 Pam3CSK4 的样品保持在 -80°C (对照组) 或储存于 4°C 长达一年时间, 随后使用 TLR Bioassay 进行分析。Bio-Glo-NL™ 试剂被加入其中, 并通过 GloMax® Discover 系统对发光进行定量。利用 GraphPad Prism 软件对四参数 logistic 曲线进行数据拟合。本次数据采用了“thaw-and-use”细胞生成。

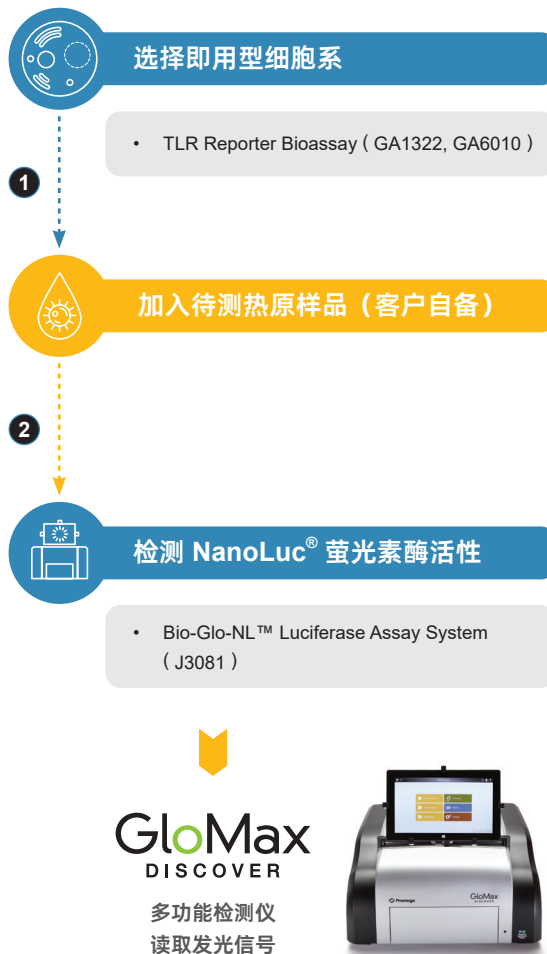


上图.TLR Bioassay 具有极佳的灵敏度。该剂量 - 响应曲线以 E. coli O111:B4 USP LPS 标准品为检测对象, 展示了 TLR Bioassay 的检测性能。EC₅₀ = 2.030 × 10⁻⁹, 反映了该方法对 LPS 的高效响应能力。LoD = 1 pg/mL = 0.01 EU (平均背景信号 + 3 × 背景信号标准差), 检测下限极低, 可满足药典对注射剂等产品的严格热原限度要求。



上图.TLR Bioassay 检测图示。TLR 激动剂处理过程会产生启动子驱动的发光信号, 可用 Bio-Glo-NL™ Reagent 定量检测。TLR Bioassay 检测使用单一基因工程细胞系: TLR Bioassay Cells。若无激动剂, TLR 不会被激活, 发光信号较低。

• 基于 TLR Bioassay 的热原检测工作流程



2. 自构建解决方案

对于已有细胞生物学平台、需要针对特定 TLR 靶点或特殊细胞系进行定制化开发的实验室，自构建方案提供了最大的灵活性——用户可自主选择萤光素酶报告基因种类、目标细胞系和检测条件，打造最契合自身需求的热原检测体系。

Promega 提供从报告基因载体、高效转染试剂到单 / 双报告基因检测试剂的全套工具组合，助力用户高效完成检测体系的构建与优化。

• 常规的萤光素酶报告基因法热原检测工作流程



3. 补充方案

• 细胞因子检测与热原检测

热原激活单核细胞后，除通过 NF-κB 通路驱动报告基因表达外，还会触发细胞释放多种促炎细胞因子，如 IL-1β、IL-6、TNF-α 等。细胞因子的释放量与热原的种类和浓度密切相关，因此除了上述报告基因检测解决方案，**细胞因子检测也可作为热原检测的重要补充和验证手段。**

• 细胞因子检测在热原检测中的应用

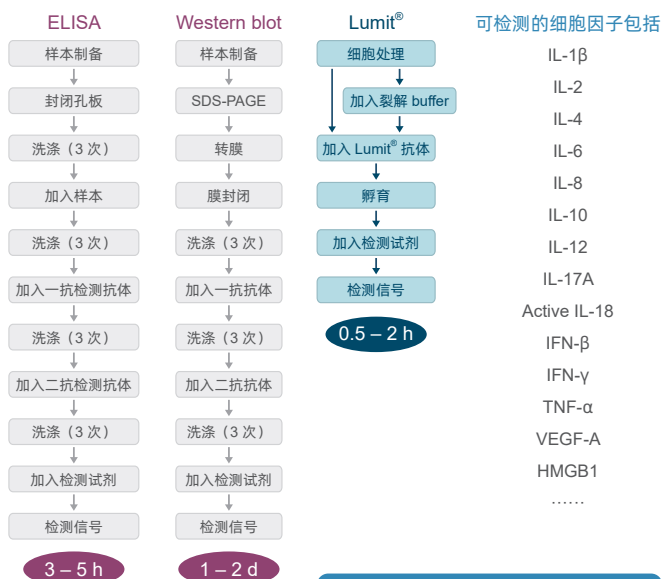
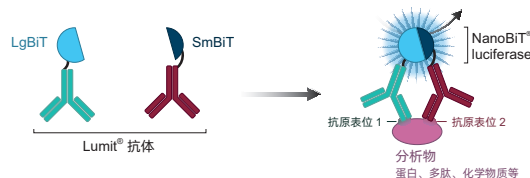
细胞因子检测法 (MAT) 是《中国药典》记载的体外热原检测方法，同样反映单核细胞对热原的活化响应。因此：

- ✓ 在方法开发和验证阶段，细胞因子检测可用于与报告基因法进行平行对比，验证新方法的准确性和可靠性；
- ✓ 对于复杂基质样品，联合检测细胞因子和报告基因信号，可提高结果的可信度和全面性。

• Promega 的细胞因子检测解决方案

Promega 一直专注于基于生物发光的萤光素酶报告基因技术的开发，并于 2020 年推出了颠覆传统 ELISA 检测方法的 Lumit[®] 免疫检测系统 (基于 NanoBiT[®] 蛋白互补技术)，具备无需洗涤、操作简单快速 (~70 分钟完成) 以及良好的高通量适配性等优势，广受客户认可。

Lumit[®] 系统不仅适用于细胞因子等分析物的快速定量检测，还可用于蛋白-蛋白及蛋白-配体相互作用的检测与表征，为药物筛选和机制研究提供高效、灵敏的解决方案。



资源下载

扫码查看完整的细胞因子检测列表及前沿应用文献



应用文献

1. He Q, Yu CF, Wu G, *et al.* A novel alternative for pyrogen detection based on a transgenic cell line. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Feb 19;9(1):33.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01744-0>
说明：来自中国食品药品检定研究院的贺庆等作者建立了基于 **THP-1/NF- κ B-luciferase** 的热原检测方法。
实验试剂：Bright-Glo™ luciferase assay
产品特点：均质法，灵敏度高
2. Qing He, Chuanfei Yu, Lan Wang, *et al.* A Novel Reporter Gene Assay for Pyrogen Detection. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 2020, Volume 73, Issue 2, Pages 111-118.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.163>
说明：来自中国食品药品检定研究院的贺庆等作者建立了基于 **THP-1/NF- κ B-luciferase** 的热原检测方法。
实验试剂：Bright-Glo™ luciferase assay
产品特点：均质法，灵敏度高
3. 王灿，刘荔桢，陈钢，等. HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法测定疫苗热原的适用性研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(3): 354-358.
<https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222350>
说明：来自上海市食品药品检验研究院的王灿等作者建立了基于 **HL60/NF- κ B-luciferase** 的热原检测方法。
实验试剂：Nano-Glo® Luciferase Assay System, pNL 3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro] plasmid
产品特点：均质法，信号更明亮，灵敏度更高，操作更简单，背景更低
4. Can Wang, Mingren Wang, Lizhen Liu, *et al.* Development and validation of a novel luciferase reporter gene assay to detect pyrogen. *Biologicals*, Volume 77,2022, Pages 16-23,ISSN 1045-1056.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.05.003>
说明：来自上海市食品药品检验研究院的王灿等作者建立了基于 **HL60/NF- κ B-luciferase** 的热原检测方法。
实验试剂：Nano-Glo® Luciferase Assay System, pNL 3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro] plasmid
特点：均质法，信号更明亮，灵敏度更高，操作更简单，背景更低
5. Yi S, Xu J, Song L, *et al.* Advancing Pyrogen Testing for Vaccines with Inherent Pyrogenicity: Development of a Novel Reporter Cell-Based Monocyte Activation Test (MAT). *Vaccines.* 2025; 13(10):1009.
<https://doi.org/10.3390/vaccines13101009>
说明：来自默克公司的几位作者共同开发了针对 **OMPC 疫苗** 的报告细胞 MAT 方法。
实验试剂：TLR Reporter Bioassay(即用型细胞系), Bio-Glo-NL™ Luciferase assay(用于检测), Nano-Glo® Luciferase Assay
6. Nanao T, Marutani Y, Sato K, *et al.* (2025) NOMO-1 cells expressing an NF- κ B luciferase reporter gene facilitate a simple, rapid monocyte activation test that can detect a wide range of pyrogens. *PLOS ONE* 20(6): e0326408.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0326408>
说明：来自富士胶片 (FUJIFILM) 几位作者共同开发了基于 **NOMO-1 细胞** 的快速 MAT 方法 (仅 3 小时)。
实验试剂：Nano-Glo® Luciferase Assay, Microplate reader (发光检测仪)

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址：北京市东城区北三环东路 36 号
环球贸易中心 B 座 907-909
电话：010-58256268
传真：010-58256160

网址：www.promega.com
技术支持电话：400 810 8133
技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com
更新时间：2026.06



关注 Promega
生命科学



联系 Promega
授权经销商