

APPLICATION NOTE

基于微孔板读板机且符合 GLP/GMP 合规环境下的内毒素检测方法

简介

污染物监测是制药和医疗器械行业生产过程中的关键环节。其中一种较常见的污染物—内毒素，它可以引起发烧、炎症、头痛、恶心，甚至死亡。内毒素是在革兰氏阴性细菌的细胞壁中被发现的，目前可以利用敏感的、特异性的鲎试剂 (LAL) 法对其进行检测。

在内毒素存在的情况下，LAL 通过酶介导的级联反应产生的凝聚现象，传统方式是我们可利用其凝聚产生的浑浊度变化对其进行定量检测。

Pyrochrome 检测试剂是美国科德角公司 (ACC) 推出的一款内毒素定量检测产品，其组成含有对硝基苯胺 (pNA) 的合成底物，由于颜色变化后可用于吸光度检测，凝集化酶是由内毒素 (间接) 激活的酶裂解底物，释放 pNA，其在 405 nm 处有很强的光吸收值，我们在微孔板读板机上进行检测，OD 值高低与样品中的内毒素浓度成正比。对于企业来说使用仪器和软件必须在相应的合规环境来获取和存储数据，维护数据完整性是一项非常重要和迫切的任务，符合 FDA 21 CFR Part 11 法规要求环境，如果使用多个软件用于数据的收集、分析并进行数据传输的话可能会导致潜在错误，并让可追溯性变的复杂。此外还额外产生应用支持、多个应用程序上验证和培训人员的费用等。

使用经过验证 Molecular Devices 的 VersaMax™ 光吸收读板机和 Pyrochrome 检测试剂进行相应检测，结合 SoftMax® Pro GxP 合规软件进行数据采集和分析。

SoftMax Pro 软件内置针对该内毒素检测试剂盒的检测模板，无需设置，直接读数后自动化获得数据并判断结果是否通过。此外，SoftMax Pro GxP 合规软件符合 GLP/GMP 指南要求，针对不同用户之间对软件进行的设置、公式修改、数据生成、电子签名文件生成都有明确分级管理的功能。

本篇应用介绍了如何针对该试剂盒在 VersaMax 光吸收酶标仪上进行参数设置、SoftMax Pro GxP 软件上获取标准曲线并绘制曲线图表过程。

材料

- VersaMax 微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #VERSAMAX)
- SoftMax Pro GxP 软件 (Molecular Devices cat. # SMP54-GXP-10UL)
- Pyrochrome 检测试剂盒 (ACC cat. #C1500)
- 内毒素质控标准品 (ACC cat. #E010)
- Pyroplate 96 孔板 (ACC cat. #CA961)

优势

- 用于生产过程中内毒素污染检测的灵敏、特异性方法
- 标准曲线中到达一定检测值的时间，利用插值法计算样品中内毒素的浓度
- 完整的数据采集和分析解决方案

方法

首先打开 VersaMax 读板机并在电脑端登陆 SoftMax Pro GxP 软件，然后在微孔板中加入试剂。

随后在 SofMax Pro GxP 软件的模板文件菜单中选择“Pyrochrome Kinetic”检测方法，可以在电脑上看见新的数据类型文件被创建。

检测方法和试剂信息可随时输入软件内置的记事本中，当然进行相应操作用户必须具有输入文本和修改公式的权限。

当具有相应的用户权限时，则可以编辑试剂样品真实的放置在微孔板区域及梯度稀释关系，我们将其分配到微孔板任何区域并可以随时进行修改。除非用户具有 SoftMax Pro GxP 软件的设置和计算功能权限，否则将无法进行相应操作。将仪器内部温度设置至 37 摄氏度。我们使用 3.2 ml 溶解缓冲液对 Pyrochrome 试剂进行充分溶解，均匀轻度混匀以避免产生大量泡面降低检测灵敏度。

我们使用 LAL 试剂专用水对标准品内毒素溶液进行一系列梯度稀释，用于制作标准品曲线溶液的最终的浓度是 50、5、0.5、0.05 和 0.005 EU/ml，每个浓度下的标准品溶液制备三个重复以 50 μ l 体积加入值微孔板中，当然要确保整个反应体系中不存在内毒素和葡聚糖污染物的干扰。

- 50 μ l LAL 试剂专用水溶液以三个复孔的方式加入微孔板中作为阴性对照
- 50 μ l 重悬 Pyrochrome 检测试剂快速加入微孔板的每个孔中

注：或者每个标准品/质控品 1:1 比率关系，100 μ l 总体积：裂解液的比率

我们将相应的微孔板迅速放入微孔板读板机中，然后点击 SoftMax Pro GxP，界面正上方绿色的“Read”按键进行检测。软件程序会执行相应设置。

- 在进行检测以前，程序步骤会要求仪器进行适当强度的自动混匀，确保液体混合均匀且不飞溅出孔外。
- 405 nm 处的吸光度值，我们每隔 10-15 秒收集一次数据，持续 1 小时，并实时显示最大灵敏度，间隔时间和总检测时间可以根据不同批次的试剂所推荐时间进行相应的调整。
- 可以设置每个孔达到某一指定 OD 值的时间，软件可以自动计算并显示出到达相应 OD 值的时间，这个模板内置的是达到 0.03 OD 值的时间点，当然可以根据实际需求进行更改。
- 使用 log-log 方式进行标准曲线进行拟合数据，至少需要三个数据点。

注：在进行自动计算和曲线拟合前必须对相应孔进行相应定义。

- 斜率、y 轴截距和相关系数见图例和总结结果的部分。

结果

获得的结果说明 VersaMax 微孔板读板机可用于 Pyrochrome 试剂进行相应检测，将平均达到 OD 值时间 (秒) 的均值与已知浓度以 log-log 拟合方式作图，得到标准曲线。(图 1)

内置于 SoftMax Pro GxP 软件的检测模板，可用于自动确定样品的分析数值和判断结果的有效性。

- 相关系数 R^2 值至少高于 0.980
- 阳性质控样品应在等效标准品浓度的 50-200% 之间
- 内毒素浓度阴性质控样品 (由标准曲线外推法确定)，应大大低于最低标准浓度

结论

我们获得一条线性标准曲线，发现曲线的复孔之间的 CV 值很小，结果反映出其检测灵敏度很高，发现可以使用 VersaMax 和 Pyrochrome 试剂进行内毒素的检测和分析，并证明其检测优异性能。借助于颜色随着时间的变化，达到某一个制定 OD 值的时间，那么 SoftMax Pro GxP 软件可通过标准品曲线自动计算出内毒素浓度，可以限制在标准曲线的起始平均时间范围内。SoftMax Pro GxP 软件对数据文件中的所有工作流程及结果进行了相应的审计追踪。在检查完结果之后，可以通过对文件进行电子签名来锁定文件，防止发生进一步的更改，而不管所分配的权限如何。可以使用多个签名来指示各种角色，例如审阅人和审批人等。

本文中通过 VersaMax 微孔板读板机和 Pyrochrome 试剂获得高灵敏和特异性检测结果。使用了 SoftMax Pro GxP 软件的 VersaMax 微孔板读板机可进行数据采集和分析，大大减低了在多个软件之间进行数据传输、分析、生成报告等所产生潜在风险和成本。

SoftMax Pro GxP 软件符合 GLP/GMP 法规 (如 FDA 21 CFR Part 11 的电子记录、审计追踪) 的要求，通过控制授权用户的权限和建立重要操作的可追溯性来维护数据的完整性。

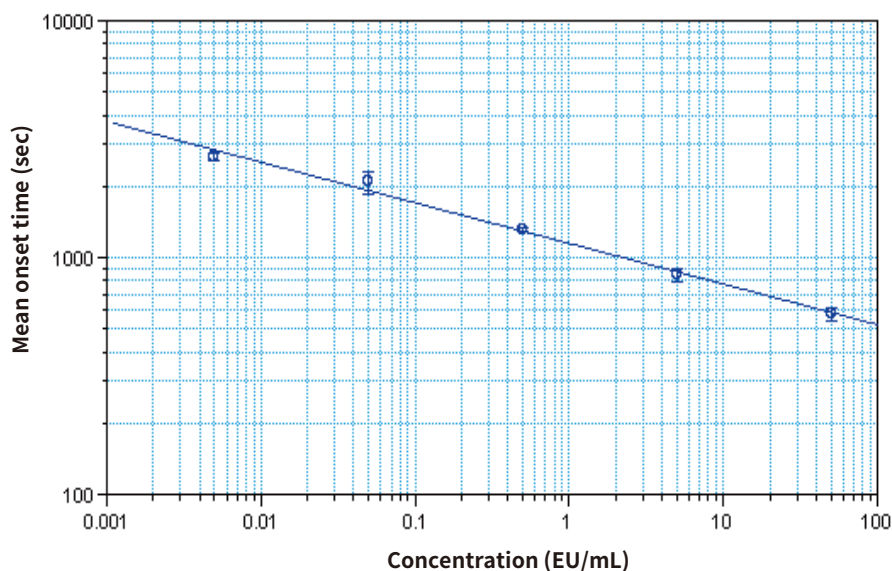


图 1 Pyrochrome 试剂制作标准品曲线。此曲线为 SoftMax Pro Gxp 软件自动拟合生成，曲线是由 5 个浓度标准样品在每个浓度 3 复孔下计算获得。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

