

# 样品与鲎试剂的 1:1 比例：其重要性以及在 Sievers Eclipse\* 月食细菌内毒素检测仪上的确认过程

## 目的

细菌内毒素测试（BET，Bacterial Endotoxins Testing）的创新技术问世后，证明平台间测试的等效性就变得至关重要。“Sievers Eclipse 比例确认测试”旨在确认使用 96 孔微孔板时的样品与鲎试剂的 1:1 比例始终对使用 Eclipse 微孔板也同样有效。只要保持 1:1 比例，就能使样品和鲎试剂（LAL，Limulus Amoebocyte Lysate，鲎变形细胞溶解物）之间的生物化学反应保持不变。即使在使用 Sievers Eclipse 平台时减少光学孔的总容积，每个孔中的 1:1 比例也能保持不变，用户可以确信样品和标准品的内毒素测量值是准确有效的。



## 背景和重要性

使用 96 孔微孔板的动态显色法细菌内毒素检测技术，要求在每个孔中加注标准品或样品与鲎试剂的混合液，然后观察液体的颜色变化。测试成功的关键在于精确控制样品和鲎试剂的用量。USP <85> 规定，对于某些测试参数（例如体积比、反应起效时间、pH 值等），应遵循鲎试剂生产商提供的使用说明（IFU，Instructions for Use）。

使用说明通常以下两种方式之一来表明如何达到正确的样品和鲎试剂的体积比：

（1）直接表明样品和鲎试剂的比例应为 1:1；

（2）指示用户加入 100  $\mu\text{L}$  的空白鲎试剂水、内毒素标准品、产品样品、阳性产品对照，然后向所有使用的孔中加入 100  $\mu\text{L}$  的鲎试剂。

有的使用说明指示用户准备 1:1 样品与鲎试剂混合液时，建议使用 100  $\mu\text{L}$ （而非典型的 200  $\mu\text{L}$ ）作为孔的总容积，并指出 100  $\mu\text{L}$  有助于达到最佳的测试灵敏度。该使用说明表明，1:1 的比例关系（而非孔的总容积）才是测试成功的关键。只要每个孔中的样品和鲎试剂的比例是 1:1，反应就能准确进行，产生的结果就是等效的。

如果比例不是 1:1，那么样品与鲎试剂的用量就不对，就会对反应动力学过程和整体测试结果产生显著影响。除了孔的总容积之外，还需考虑反应速度。如果反应较快，那么起始反应时间就较短，内毒素浓度就较高。如果反应较慢，则情况相反——起始反应时间较长，内毒素浓度较低。

错误的比例还会影响鲎试剂在与样品混合时的自然缓冲能力。如果达不到 1:1 的精确比例，则反应混合液的 pH 值就不在建议的 6 - 8 范围之内，就会影响测试的整体反应动力学过程。

## 1:1 比例确认测试

1:1 比例确认测试旨在证明在 Sievers Eclipse 微孔板的 104 个孔中都达到了鲎试剂和样品的 1:1 精确比例。进行测试时，用户需要一个新的 Sievers Eclipse 微孔板和 Sievers Eclipse 1:1 比例确认套件（部件号是 STD 85000-01），该套件包括一个水瓶和一个染色剂瓶。开始分析之前，Eclipse 软件会指导用户在对应的位置和鲎试剂 LAL 端口，完成水和染色剂的准备和

注射。然后，Eclipse 微孔板按照正常分析时的步骤运行。1:1 比例确认测试不依赖于动力学酶促反应，因此测试所需的总时间较短。

## 1:1 比例确认测试的报告内容

分析完毕后，Eclipse 软件的“1:1 比例结果 (1:1 Ratio Results)”选项卡中会显示报告。报告内容除了包括在运行测试之前输入的常规信息（例如分析仪序列号、Eclipse 微孔板信息、1:1 比例确认样品信息），还包括 104 个光学孔的各自的平均光密度。

在报告的“结果”部分下面，分别显示微孔板的“染色剂”部分和“水”部分的总体平均光密度。染色剂分别同微孔板另一半上的染色剂和水混合，产生上述两个平均值。下面的方程 1 用于计算总体平均光密度值，该值显示溶液的混合是否成功。这可以用来表示在正常分析时样品和 LAL 是如何混合的。

### 方程式 1:

$$\frac{\text{染色剂平均值}}{\text{水平均值}} = \text{比例}$$

在染色剂与染色剂混合的孔中，理想的比例为 1（即染色剂平均值）。在染色剂与水混合的孔中，染色剂被稀释到原来浓度的一半，理想的比例为 0.5（即水平均值）。将这两个平均值相除，得出的理想比例为 2，表示到达光学孔的染色剂和水的量完全相同。对于本次测试来说，1.90 至 2.10 之间的比例都是有效的，不影响整体反应动力学曲线和内毒素回收率。

\*苏伊士的商标，在一个或多个国家注册。

©2020 年苏伊士。版权所有。

## 结论

Sievers Eclipse 微孔板是精密设计的微流控液体处理设备。此款微孔板利用计量分配腔，以恒定的通道几何形状和运动方式，将精确等量的样品和试剂同时送到光学孔中。正是 Eclipse 微孔板的精密的液体控制能力，确保了每次测试的所有 104 个光学孔中都达到样品与试剂的 1:1 关键性比例。

试剂生产商提供的使用说明可能会直接表明 1:1 比例，也可能会指导用户混合一定量的样品和试剂，但液体总体积未必一定是 200  $\mu\text{L}$ 。如果光路径较长，或者为了进行精确移液，生产商会建议设置较大容积，以提高测试精度。对于标准的 96 孔微孔板来说，建议设置的孔的总容积在 75 - 200  $\mu\text{L}$  范围内。“为了进行有效测量，建议设置的微孔板的最小孔容积通常大于最大孔容积的 1/3。”<sup>1</sup> 所以，每次测试的每个孔中的样品与试剂的比例达到 1:1，非常重要，而没有必要使用整个孔的容积。

在 Sievers Eclipse 平台上进行 1:1 比例确认测试的结果证明，即使孔的总容积显著减小，每次测试的每个光学孔中都能达到至关重要的 1:1 比例。始终保持 1:1 的精确比例，用户就能确认在转换平台时，生物化学过程是等效的。建议每年由 SUEZ 公司认证的现场服务工程师或代表来完成此项确认测试任务。

### 参考文献

1. Pusterla, Tobias, PhD. "Which is the best microplate for my assay?" BMG Labtech, 2018 May 30. <https://www.bmg-labtech.com/which-is-the-best-microplate-for-my-assay/>

300 00091 CS Rev. A

## 联系我们，了解更多！

### 北京新恒能分析仪器有限公司

地址：北京市朝阳区西大望路 63 号院阳光财富大厦 903 室

总机：010-59799897 转 808/806/817

直线：010-59602317 59602519

企业 QQ：销售部：300-466-2597/300-469-8016

客服部：300-460-0217/300-460-3818

手机：13701397969 13901063870

E-mail: winers@yaojian.com.cn

<http://www.yaojian.com.cn>



扫描二维码，关注新恒能