

2018年8月15日

**关键词或短语:**

Picus<sup>®</sup>、qPCR、Master Mix、低吸附吸头的重现性、电动移液器

## 使用电动移液器移取PCR Master Mix的优势

**Marian Teye, Ph.D.**

Sartorius Biohit Liquid Handling, Laippatie 1, 08800 Helsinki Finland

通讯作者

电子邮箱: LHinfo.Finland@sartorius.com

### 摘要

定量聚合酶链反应(qPCR)分析具有高灵敏度,这是其成功并广泛应用于科学实验室的最重要原因之一。然而,包括移液技术在内的许多因素都会对qPCR分析的结果产生影响。PCR Master Mix 通常在qPCR准备期间使用,但可能很难对其进行准确移液。在本研究中,我们测试了在qPCR中使用电动移液器移取Master Mix。研究证明,使用电动移液器搭配低吸附滤芯吸头或标准滤芯吸头对Master Mix移液,可获得良好的精准性。使用电动移液器确保了移液速度及结果的重现性。我们得出结论,在进行基于PCR的分析时,使用电动移液器移取Master Mix可确保可重复且可靠的结果。



了解更多: [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

## 引言

基于PCR的应用已成为生物制药工艺、临床诊断和学术研究的关键手段。然而，在执行定量聚合酶链反应(qPCR)时，实验结果的可变性可能是个问题<sup>1</sup>。移液误差是需要重点关注的变化来源之一。在qPCR准备阶段，对Master Mix试剂进行移液具有挑战性。Master Mix通常由聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub>以及可能含吐温和甘油成分的缓冲液组成。<sup>2</sup>如今，市面上可买到即用型Master Mix溶液。由于Master Mix必须在冰上存放，所以液体有点粘稠和冰冷。这些特性使得移取正确体积的Master Mix变得困难。

本应用说明的目的是测试在PCR分析应用中使用电动移液器移取Master Mix的可靠性。在定量PCR准备阶段，使用电动移液器搭配低吸附滤芯吸头来移取Master Mix，实验结果(定量循环，C<sub>q</sub>)由以下方面进行评价：

- 准确度和精确度(重现性)



## 方法

### 移液器和移液器吸头

使用赛多利斯Picus®电动移液器、赛多利斯Safetyspace低吸附滤芯吸头和赛多利斯Safetyspace滤芯吸头。Picus®使用多次分液模式。移取Master Mix时，将电动移液器速度参数设置为<sup>1</sup>。

### qPCR准备

qPCR准备阶段使用赛多利斯Picus®电动移液器、赛多利斯Safetyspace滤芯吸头及低吸附滤芯吸头。Lo-Bind EP管(Eppendorf)用于DNA样品制备及Master Mix的制备。制备用于所有测试的PCR Master Mix储备液使用了Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(不含ROX)(Thermo Fisher Scientific)、大肠杆菌uidA基因引物以及无核酸酶水。

PCR引物UAL 5'-TGGTAAT-TACCGACGAAAACGGC(Sigma-Aldrich)和UAR 5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG(Sigma-Aldrich)扩增了一个大肠杆菌基因组DNA中uidA基因的147 bp片段。大肠杆菌菌株含有uidA基因的一个单拷贝基因。<sup>4</sup>用移液器将八个15 µL的Master Mix重复样品移取至PCR板孔中，用于各种测试条件。无模板对照(NTC)样品不含大肠杆菌基因组DNA，并加入5 µL无核酸酶水。用类似方法移取5 µL含有1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>3</sup>以及1×10<sup>2</sup>个拷贝1反应大肠杆菌gDNA的系列稀释标准品)。

在每个测试孔中有5 µL含有1×10<sup>3</sup>个拷贝1反应的大肠杆菌gDNA。使用Picus®电动移液器的多次分液功能及低吸附滤芯吸头以相同的方式将所有DNA样本添加到PCR管中。使用LightCycler®480 qPCR仪(Applied Biosystems, Foster City, CA)进行qPCR。循环参数如下：在95°C下预培养10分钟，随后在95°C 10秒、55°C 10秒、75°C 15秒，75°C延伸10秒，40个循环。

对标准品、对照品和样品中的SYBR绿色荧光激发进行定量。使用LightCycler®480软件确定定量循环(C<sub>q</sub>)值和实际拷贝数，并使用MS Excel分析结果。

### 数据分析

C<sub>q</sub>值的百分比系统误差(%S)反映了处理Master Mix的仪器系统(移液器和吸头系统)C<sub>q</sub>值的误差。移液过程中的随机误差是结果精确度的测量，反映了实验中重复样品之间的差异。C<sub>q</sub>值的百分比随机误差(%R)反映了结果的重现性，并且可能受到实验人员移液操作的影响。

## 结果

使用赛多利斯Picus® 电动移液器搭配低吸附滤芯吸头测试电动移液器移取Master Mix的效果。采用了电动移液器的多次分液模式。如图1所示,当使用低吸附滤芯吸头移取Master Mix时,电动移液器的多次分液模式所得结果为: $Cq=24.54\pm 0.09$ 、 $Cq$ 的百分比系统误差=0.12、 $Cq$ 的百分比随机误差=0.37;相比之下,采用标准滤芯吸头所得结果为: $Cq=24.52\pm 0.16$ 、 $Cq$ 的百分比系统误差=0.04,  $Cq$ 的百分比随机误差=0.67。在这两种情况下,电动移液器所得的结果都具有良好的重现性(百分比随机误差),且 $Cq$ 值的百分比系统误差均保持在低水平。电动移液器的多次分液模式可确保通过一次吸液后,将Master Mix按顺序分配到所有八个重复孔中,显著提高了移液速度也减少了移液器吸头的使用数量,更环保的同时也减少了更换吸头造成的差异。

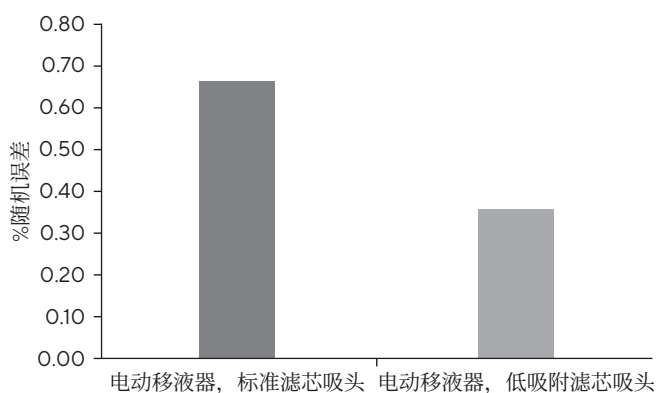


图1: Master Mix多次分液的 $Cq$ (定量循环)百分比随机误差。对于每个数据点,  $n=8$ 。使用电动移液器移取Master Mix得到的 $Cq$ 值百分比误差低。与标准滤芯吸头相比,使用低吸附滤芯吸头得到的随机误差更低。低吸附滤芯吸头采用的是赛多利斯Safetyspace低吸附滤芯吸头。

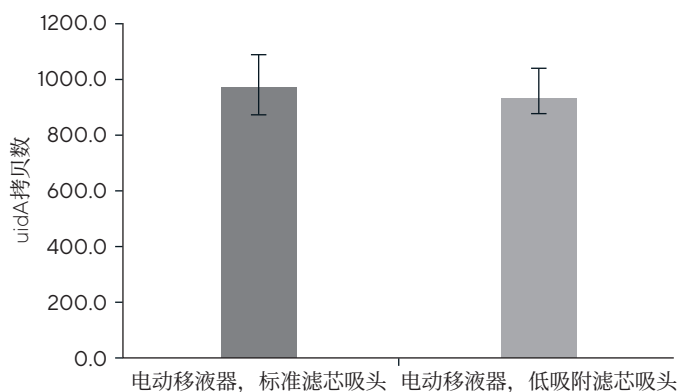


图2: 定量的大肠杆菌uidA拷贝数。对于每个数据点,  $n=8$ 。低吸附滤芯吸头为赛多利斯Safetyspace低吸附滤芯吸头。

## 讨论

在本研究中,对PCR实验的重要组成部分Master Mix的移液进行了研究,以确定使用电动移液器所获结果的准确度和精确度。研究证明,在PCR准备阶段使用电动移液器可以得到出色的结果,结果的百分比误差很低。与标准滤芯吸头相比,使用电动移液器的多次分液模式搭配低吸附滤芯吸头可提供更好的结果。对于仍使用标准移液器吸头移取Master Mix的实验室来说,多次分液搭配标准滤芯吸头可提供更佳的结果重现性(精确度)。



## 结论

我们得出结论, 基于PCR原理的实验中使用电动移液器移取 Master Mix可确保高准确度和精确度。此外, 电动移液器可加快完成实验的速度, 减少移液所需的时间, 使操作更符合人体工程学。因此, 使用电动移液器可以降低实验室工作人员患上重复性劳损(RSI)的可能性, 并使实验更不容易出错;此外, 它还能在相同的实验中使用更少的移液器吸头, 因此也是更环保的选择。

## 参考文献

1. Murphy, J., & Bustin, S.A. (Feb/March, 2010). Real-time quantitative PCR as a bioanalytical tool in the pharmaceutical industry. *International Drug Discovery*.
2. Yang, J., Kemps-Mols, B.M., & Spruyt-Gerritse, M.J. (2016). The source of SYBR green master mix determines outcome of nucleic acid amplification reactions. *BMC Res Notes*, 9(1), 292.
3. Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.L., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., & Olson, B.H. (1993). Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbellifer-yl-beta-D-glucuronide media. *Appl Environ Microbiol*, 59(7), 2271-2276.

## 销售与服务 联系方式

更多联系信息, 请访问  
[www.sartorius.com.cn](http://www.sartorius.com.cn)

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889  
邮箱 [lab.cn@sartorius.com](mailto:lab.cn@sartorius.com)

**赛多利斯 (上海) 贸易有限公司**  
上海市浦东新区盛荣路 388 弄百佳通  
产业园 3 号楼, 7-11 层, 200120  
电话 +86 21 6066 6100

