

2018年4月9日

关键词或短语:

qPCR、Master Mix、重现性、低吸附吸头、预润洗、手动和电动移液器

如何移液PCR Master Mix以提高qPCR结果的准确性

Marian Teye

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,我们确定了在qPCR分析中对Master Mix进行移液的理想移液技术。我们对正向和反向移液技术、移液器吸头的类型、移液器吸头的预润洗以及电动移液器的使用进行了测试。测试中使用了赛多利斯Tacta® 手动移液器和赛多利斯Picus® 电动移液器。研究证明,使用低吸附移液器吸头搭配正向移液技术或使用标准移液器吸头搭配反向移液技术对Master Mix进行移液可获得良好的精确度和准确度。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原理的分析实验时,对于Master Mix的移液需重点关注良好的移液技术及耗材的正确选择,从而获得可重现且可靠的结果。

引言

基于PCR原理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。在生物制药行业中，PCR应用(如qPCR或二代测序)的高灵敏度使其能够用于检测单克隆抗体药品中的残留病毒物质，或为无人类DNA产品提供符合监管标准的证据。基于qPCR的诊断测试的检测限(LoD, LoQ)在临床诊断中非常重要。¹然而，在执行定量聚合酶链反应(qPCR)时，分析结果的可变性可能是个问题。²

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、dNTPs、MgCl₂以及可能含有吐温和甘油成分的缓冲液组成。³如今，市面上能买到即用型Master Mix试剂。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。在文献检索中，关于如何处理Master Mix的建议并没有明确良好实践指导。在许多实验室，特别是在涉及大量样品和重复样品的qPCR分析中移取Master Mix时，通常的做法是不预润洗移液器吸头以加快实验准备的时间，而且，对于大量实验而言，在为每个PCR管移取Master Mix之前对移液器吸头进行预润洗是一项具有挑战性的工作，这也会导致气泡的产生。

根据ISO-8655，应在移液前对移液器吸头进行预润洗，尤其是移取粘性液体时。对于粘性液体，预润洗的作用类似于反向移液技术(如下所述)中吸入的额外样品体积，并对因粘性液体在分配过程中粘附在标准塑料移液器吸头上而导致的样品损失进行补偿。目前，研究人员可以选择使用低吸附移液器吸头，当移取粘性液体时可大大减少滞留在移液器吸头上的残留样品量。

在本应用说明中，我们提供了如何一致地移取qPCR Master Mix的指南和良好移液实践。

在本应用说明中，我们对Master Mix的移取进行了以下测试：

- 正向移液与反向移液
- 移液器吸头类型
- 预润洗
- 使用电动移液器的优势



方法

移液技术

移液器是一种精密仪器，它与吸头组合为一个系统来发挥作用。为避免因移液不当而导致数据变化，在整个实验过程中坚持使用正确的移液技术。简言之，在移液器上使用同厂家(赛多利斯)的吸头，以确保移液器和移液器吸头之间的恰当密封。在吸液过程中保持移液器垂直。吸液过程中，将吸头浸入Master Mix中的深度保持在2mm，以避免吸入体积过多，并避免过多的Master Mix粘附在移液器吸头外侧。在排液过程中，移液器呈45度角，移液器吸头接触PCR管的内侧。Master Mix的粘性大，移取时需缓慢操作。正向移液和反向移液技术如图1所示。

qPCR准备

qPCR准备阶段使用赛多利斯移液器(Tacta® 手动移液器和Picus®Nxt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。使用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来制备用于所有测试的PCR Master Mix储备液。PCR引物UAL 5'-TGGTAAT-TAC-CGAC-GAAAACGGC(Sigma-Aldrich)和UAR 5'-ACGC-GTGGTTA-CAGTCTTGCG(Sigma-Aldrich)扩增了大肠杆菌基因组DNA中uidA基因的一个147 bp片段。大肠杆菌菌株含有uidA基因的一个单拷贝。⁴用移液器重复将八个15 µL的Master Mix移取至PCR板孔中，用于各种测试条件。

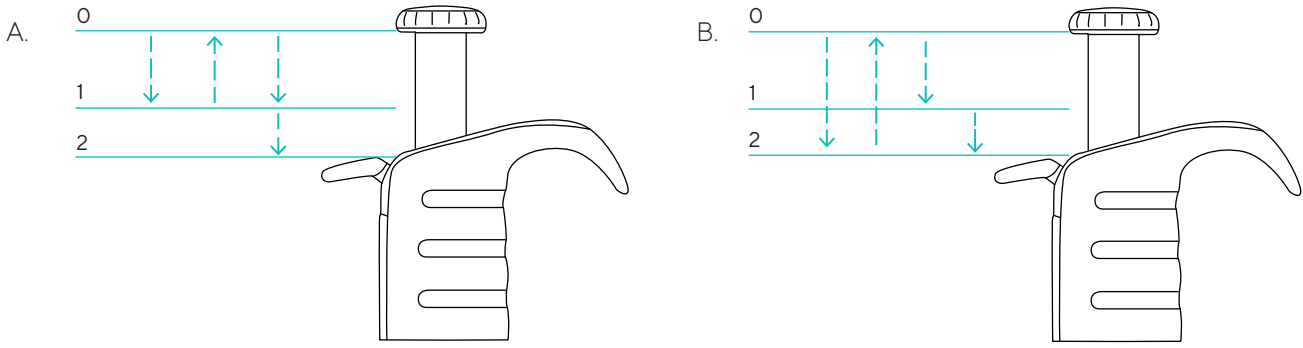


图1: (A) 正向移液操作步骤和 (B) 反向移液操作步骤。

无模板对照 (NTC) 样品不含大肠杆菌基因组DNA, 并加入了 5 μ L 无核酸酶水。用类似方法移取含有 5 μ L 大肠杆菌gDNA 的系列稀释标准品 (含有 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 以及 1×10^2 个拷贝/反应)。在每个测试孔中加入 5 μ L 含有 1×10^3 个拷贝/反应的大肠杆菌gDNA。使用Picus® Nxt电动移液器的多次分液功能配合低吸附滤芯吸头, 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分析。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, 三步循环 40 次, 最后在 75 °C下延伸 10 秒。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(Cq)值和实际拷贝数, 并使用MS Excel分析结果。

数据分析

移液过程中的系统误差是准确度的一种度量——它反映了所得结果与真实值的接近程度。Cq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)Cq值的误差。移液过程中的随机误差是结果精确度的一种度量, 反映了实验中重复样品之间的差异。Cq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。百分比不确定度的数值同时说明了结果的准确度(百分比系统误差)和精确度(百分比随机误差)。

结果

正向移液和反向移液

使用Tacta®手动移液器、标准Safetyspace滤芯吸头和低吸附(LR)滤芯吸头, 对使用正向移液与反向移液移取Master Mix进行比较, 并将正向移液预润洗与反向移液前的预润洗与否的结果进行比较。如图2所示, 使用低吸附滤芯吸头搭配正向移液技术获得了最佳的结果(Cq的百分比系统误差=0.02, Cq的百分比随机误差=0.46, Cq的百分比不确定度=0.9)。第二好的方法是使用标准滤芯吸头搭配反向移液技术(Cq的百分比系统误差=0.22, Cq的百分比随机误差=0.50, Cq的百分比不确定度=1.2)。因此, 使用低吸附移液器吸头搭配正向移液技术或使用标准移液器吸头搭配反向移液技术是准确且精确地移取Master Mix的良好方法。这一结果还表明, 低吸附移液器吸头的低吸附性能消除了反向移液技术或预润洗技术中由于液体的粘稠性而需要额外的样品去补偿粘附在标准移液器吸头上造成的损失。

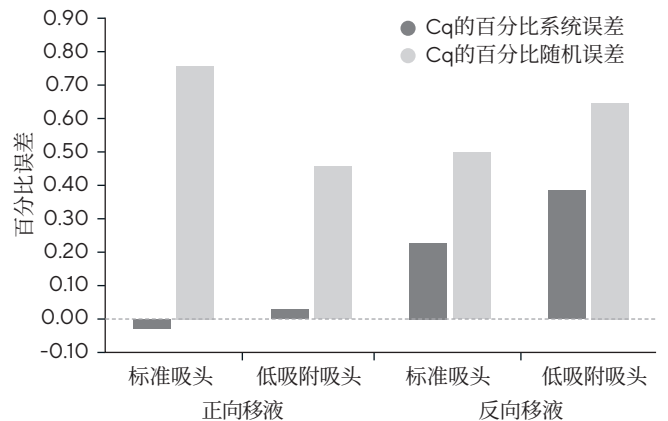


图2: Master Mix正向和反向移液的Cq (定量循环)百分比误差。显示了Cq (定量循环)的百分比系统误差和Cq的百分比随机误差。对于每个数据点, n=8。与反向移液相比, 正向移液的系统误差较低(灰色条)。标准吸头为赛多利斯Safetyspace滤芯吸头, 低吸附吸头为赛多利斯Safetyspace低吸附吸头。

移取Master Mix前对移液器吸头进行预润洗

预润洗能够调节空气置换式移液器的空气柱,并用额外的样品在移液器吸头的内侧形成液体膜,以提高结果的重现性(精确度,百分比随机误差)。使用Tacta®手动移液器和标准Safetyspace滤芯吸头,在移取Master Mix之前对移液器吸头预润洗5次。如图3所示,与ISO-8655一致,对于使用标准滤芯吸头吸取Master Mix,与正向移液前不进行预润洗(C_q的百分比随机误差=0.8)相比,正向移液前预润洗吸头略微改善了结果的重现性(C_q的百分比随机误差=0.7)。然而,与使用正向移液搭配预润洗技术(C_q的百分比随机误差=0.7)相比,使用标准滤芯吸头搭配反向移液技术具有更好的结果重现性(C_q的百分比随机误差=0.5)。与预期结果相同,与反向移液前不进行预润洗(C_q的百分比随机误差=0.5)相比,反向移液前预润洗对结果的重现性没有显著影响(C_q的百分比随机误差=0.5),因此反向移液前无需预润洗标准滤芯吸头。值得注意的是,与在正向移液前进行预润洗(C_q的百分比随机误差=0.7)相比,使用低吸附滤芯吸头搭配正向移液技术移取Master Mix具有更好的重现性(C_q的百分比随机误差=0.5)。这一结果也与之前的研究结果一致,即对于冷液体,可以通过不润洗移液器吸头来降低使用室温移液器及吸头进行移液所造成的不精确性。

低吸附移液器吸头及标准移液器吸头

使用赛多利斯低吸附滤芯吸头和Safetyspace滤芯吸头搭配Tacta®手动移液器对适用于移取Master Mix的移液器吸头类型进行了测试。由于低吸附塑料在防止DNA粘附的优势已得到了很好的证实,在DNA样品和DNA标准品的制备,以及引物的移取环节都使用了低吸附滤芯吸头。⁵对于移取Master Mix,如图4所示,使用正向移液技术时,与搭配标准滤芯吸头(C_q百分比随机误差=0.8, C_q百分比系统误差=-0.03, 百分比不确定度=1.6)相比,搭配低吸附滤芯吸头的重现性更好,且C_q值的不确定度更低(C_q百分比随机误差=0.5, C_q百分比系统误差=0.02, 百分比不确定度=0.9)。这一结果表明,低吸附吸头最适合用于处理PCR Master Mix。

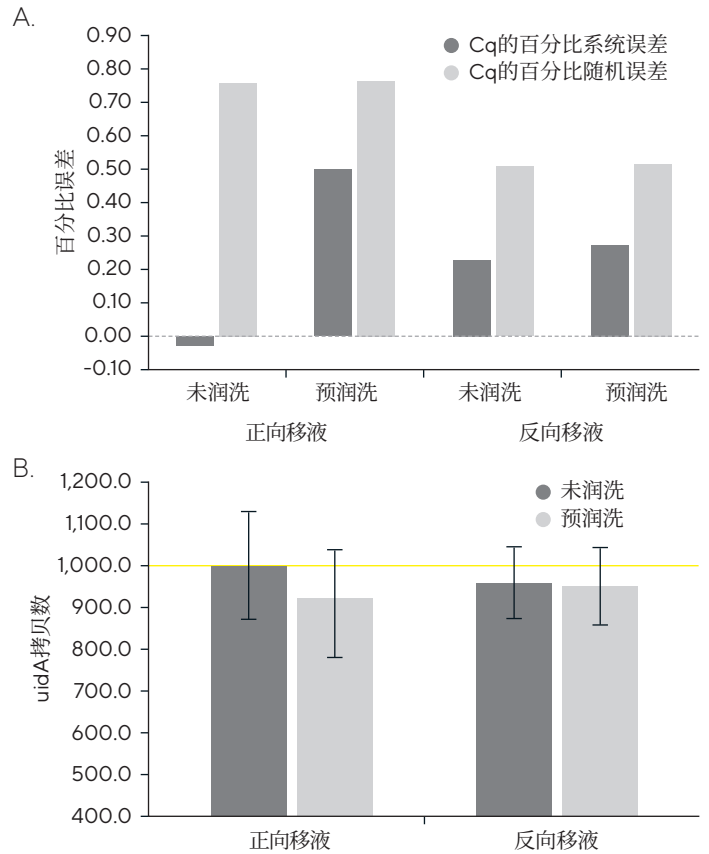


图3: (A) 在移取Master Mix时,移液器吸头预润洗和不润洗的C_q(定量循环)百分比误差,显示了C_q(定量循环)的百分比系统误差和C_q的百分比随机误差。对于每个数据点,n=8。
(B) 量化的大肠杆菌uidA拷贝数。黄线表示实际目标数量。正向移液不润洗的系统误差比预润洗更低。标准吸头为赛多利斯SafetySpace滤芯吸头

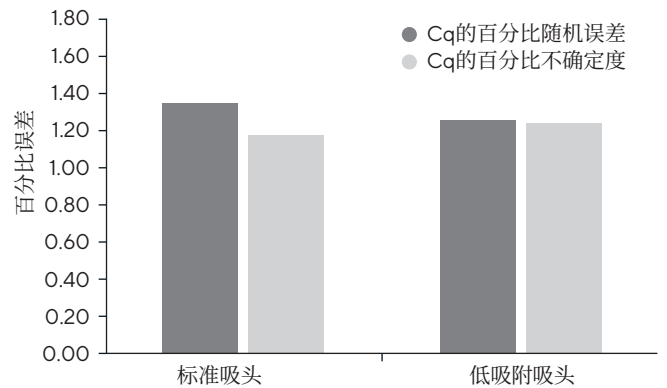


图4: 使用标准吸头和低吸附吸头移取Master Mix的百分比误差。显示了C_q的百分比随机误差和C_q的百分比不确定度(百分比随机误差和百分比系统误差)。采用正向移液技术。对于每个数据点,n=8。与标准吸头相比,低吸附吸头的百分比不确定度较低。标准吸头为赛多利斯Safetyspace滤芯吸头,低吸附吸头为赛多利斯Safetyspace低吸附吸头。

电动移液器

使用赛多利斯Picus® Nxt电动移液器、赛多利斯Tacta®手动移液器搭配低吸附滤芯吸头, 移取Master Mix进行了对比测试。电动移液器使用了多次分液模式。手动移液器采用正向移液技术。如图5所示, 当使用低吸附滤芯吸头移取Master Mix时, 采用电动移液器的多次分液模式所得结果为: $C_q=24.54\pm 0.09$, C_q 的百分比系统误差=0.12, C_q 的百分比随机误差=0.4, C_q 的百分比不确定度=0.9; 相比之下, 采用手动移液器的正向移液所得结果为: $C_q=24.52\pm 0.11$, C_q 的百分比系统误差=0.02, C_q 的百分比随机误差=0.5, C_q 的百分比不确定度=0.9。使用电动移液器得到的结果具有良好的重现性(百分比随机误差), 且其 C_q 值的总体百分比不确定度与手动移液器相当, 都处于较低水平。电动移液器的多次分液模式可确保一次吸液, 即可将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, 并减少移液器吸头的使用数量, 更环保的同时也减少了不同吸头之间的差异。

讨论

移液是PCR检测的基础。在本研究中, 对Master Mix(PCR的一个重要组分)的移液进行了研究, 以确定准确度和精密度所需的最佳移液技术和条件。此处我们已经证明最佳技术搭配是使用正向移液技术搭配低吸附滤芯吸头。对于仍使用标准移液器吸头移取Master Mix的实验室, 反向移液技术可提供次佳的结果重现性(精密度)。我们证明, 电动移液器能够确保较高的准确度和精密度, 并加快完成分析的速度, 减少移液所需的时间, 使操作更符合人体工程学。因此, 它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。

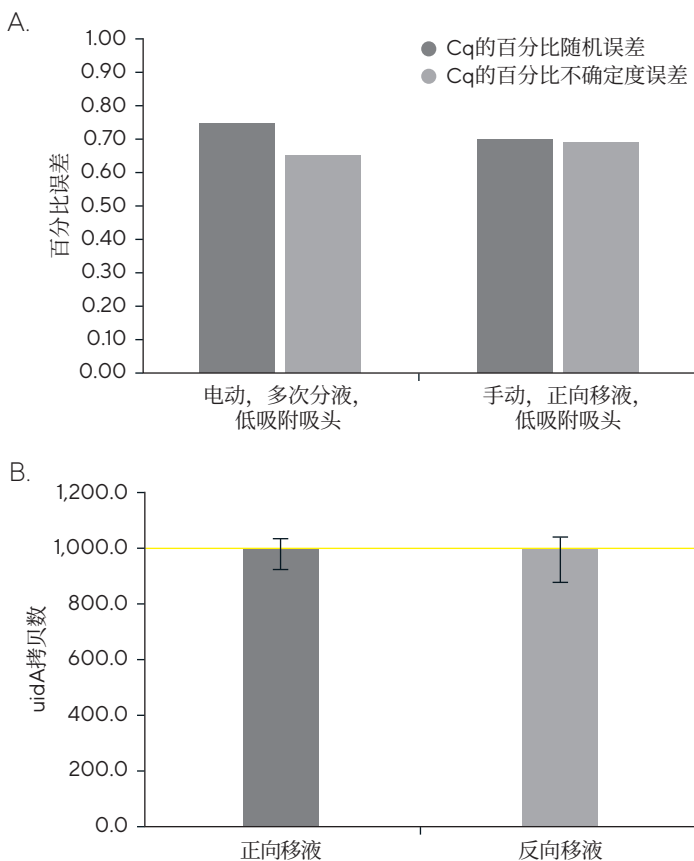


图5: (A)使用电动或手动移液器移取Master Mix时的误差百分比。显示了 C_q 的百分比随机误差和 C_q 的百分比不确定度(百分比随机误差和百分比系统误差)。手动移液器采用正向移液技术, 电动移液器采用多次分液模式。(B)量化的大肠杆菌uidA拷贝数。黄线表示实际目标数量。对于每个数据点, $n=8$ 。低吸附吸头为赛多利斯SafetySpace低吸附吸头。



结论

我们从这项研究得出结论, PCR实验中移取Master Mix的良好实践是使用理想的移液器和移液器吸头组合(手动移液器或电动移液器, 搭配低吸附移液器吸头)及正确的移液技术(使用低吸附吸头搭配正向移液技术, 或使用标准移液器吸头搭配反向移液技术)。这些建议非常重要, 可确保准确、精确地移取Master Mix, 从而将分析结果的可变性降至最低。移液技术和吸头类型之间的差异还强调, 为了获得良好且可重现的结果, 重要的是在实验之间不要改变吸头类型或移液技术。本研究结果特别适用于需要汇报实验的CV%和Z因子, 以便为最终用户提供理想参数的实验开发、诊断和质量控制人员。这些指导意见对于执行定量分析的个人也很重要, 例如确定肠道微生物群特征, 其中细菌的检出和定量可通过qPCR, 或在研发过程中测定细胞培养上清液和细胞培养基成分中的细菌污染, 或用于合规性测试, 例如根据EP/USP-JP, 使用qPCR试剂盒进行测试, 如Microsart® Research细菌检测试剂盒(赛多利斯)。

参考文献

1. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., & Wittwer, C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-22.
2. Murphy, J., & Bustin, S.A. (2010). Real-time quantitative PCR as a bioanalytical tool in the pharmaceutical industry. *International Drug Discovery*, Feb March.
3. 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.
4. 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.
5. Lewis, L.K., Robson, M., Vecherkina, Y., Ji, C., & Beall, G. (2010). Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes. *Biotechniques*, 48(4), 297-302.



销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯（上海）贸易有限公司

邮箱 lab.cn@sartorius.com

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

上海

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

北京

北京市顺义区空港工业区 B

区裕安路 33 号, 101300

电话 +86 10 8042 6300

苏州

苏州市虎丘区科技城锦峰路

158 号 101park-28 幢 201,

215163

电话 +86 512 6616 0490

广州

广州市越秀区水荫路 117 号

1105 单元, 510075

电话 +86 20 3761 7284

西安

西安市和平路 118 号和平银

座 1107 室, 710001

电话 +86 29 8751 2305

成都

成都市上东大街 246 号新良

大厦 2406 室, 610012

电话 +86 28 8666 6877

