

epMotion 5070/5075 自动移液工作站的污染测试

简介

严格来说，**contamination**这个词包含两种不同的含义：一种是真实意义上的污染，另一种是交叉污染。交叉污染的定义为前一个样品 **A** 干扰了后一个样品 **B**，这种污染的发生只存在于从 **A** 到 **B** 的液体转移过程中，而且会影响到整个所要接触到的液体体系。交叉污染既可能发生在移液过程的局部，也可能影响到整个液体流通的系统。相对交叉污染而言，真实意义上的污染是指外界物质进入了样品中，比如液体的飞溅、固体颗粒的混入或气溶胶的污染。在这种污染过程中，样品 **A** 和样品 **B** 之间都有可能发生互相的污染。

我们可以用很多种定性或定量的方法来检测污染的程度。在分子生物学上，可以用众所周知的 **PCR** 方法来测试，将 **PCR** 试剂加入 **96** 孔或 **384** 孔这种棋盘式布局的反应板中，相邻两列之间分别加入水和 **DNA** 模板，**PCR** 反应结束后，进行凝胶检测，然后评估孔间是否发生交叉污染。

另外一种定量测试的方法是将去离子水和 **LiCl** 溶液（饱和的 **LiCl** 溶液）间隔加入到 **96** 孔或 **384** 孔棋盘式布局的反应板中，然后用火焰分光光度计检测 **Li** 元素。这个方法是用于测试移液吸头的质控方法。由于这个方法的检测灵敏度可以达到 **0.1 nl**（= **6.1 ng** 的 **Li**），因此可以对污染的程度给出一个定量的测试。根据 **Specker** 和 **Kaiser**^[1] 的结果表明，火焰分光光度计检测 **Li** 元素的灵敏度可以达到 **1 ng Li/ml**（= **1 ppb Li**），**5 ng Li/ml** 或以上浓度的 **Li** 的检测信号就已经十分稳定了。

不像 **Na** 和 **K** 元素，虽然在同一浓度下能够被检测到，但很难作为污染程度的测定判断。这样，如果在加入水的孔内检测出 **Li** 元素信号，则必然是在 **Li** 溶液转移到其他孔中的过程中带入了微小的液滴污染。

以上描述的这个 **LiCl** 测定方式从方法学角度上来说是能够评估移液步骤中的污染程度的。这个方法相比 **PCR** 反应而言，更加稳定，不容易受到干扰，在 **PCR** 反应中，有很多因素会影响到最终结果的准确性，如样品或试剂被污染，不合适的热循环数等等。但在 **LiCl** 的测试方法中就不会出现这些因素的干扰，也不会影响最终结果。

材料和方法

以上描述的方法是采用 **PCR** 板和 **epMotion 5070/5075** 自动移液工作站进行测试的。

如果要测试含有甘油的溶液的污染可能性，可以选用接近饱和的 **LiCl** 溶液（**375g LiCl/l**）作为储藏液，这对应于 **Li** 含量为 **61 mg/ml**（相当于 **61,000,000 ng Li/ml=61 ng Li/nl**）。这种接近饱和的 **LiCl** 溶液密度大约为 **1.2 g/ml**，它的液体流动特性与 **40-60%** 的甘油非常相近。反之言之，如果要测试含水量高的溶液的污染可能性，可以将储藏浓度的 **LiCl** 溶液 **1** 份加 **9** 份水进行 **1:10** 的比例稀释，这对应于 **Li** 含量为 **6,100,000 ng/ml**（= **6.1 ng Li/nl**）。稀释液为去离子水。

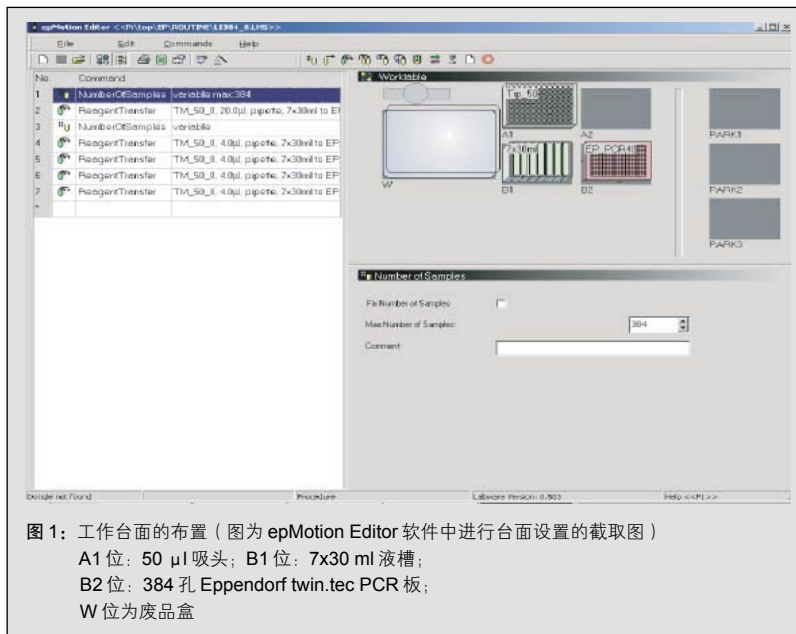


图 1：工作台面的布置（图为 epMotion Editor 软件中进行台面设置的截图图）

A1 位：50 μ l 吸头；B1 位：7x30 ml 液槽；
B2 位：384 孔 Eppendorf twin.tec PCR 板；
W 位为废品盒

污染测试中使用了 epMotion 5070/5075 自动移液工作站、一个 384 孔 PCR 反应板、单道 50 μl 量程的分液器或 8 道 50 μl 量程的分液器和配套的 epTIPS 50 μl 吸头。测试中运行了 Li384_1 和 Li384_8 两个程序，这两个程序存储在 ep-node 的“Routine”文件夹下。这个文件夹里面存储的都是些预编程序，可以直接调用。

每一孔中先加入 30 μl 去离子水，然后按照黑白棋盘的模式分别间隔加入 4 μl 水或 4 μl LiCl 储藏液。由于 ELEX 检测需要至少 1 ml 的液体量，这样检测的液体可以有 1,030 μl 。假设来自于 LiCl 溶液污染的液滴有 0.1 nl (=6.1 ng Li) 进入到只有 30 μl 水的样品孔里（在后续的检测中是在 1,030 μl 的体积），这样的浓度，火焰分光光度计就可以得到很稳定的信号，即对应的检测浓度约为 6 ng Li/ml。如果是用 1+9 稀释的溶液测试的，则污染液滴约 0.2 nl (=1.2 ng Li) 时的检测信号正好在分光光度计检测灵敏度范围之内。



图 2: 384 孔 Eppendorf twin.tec PCR 反应板的棋盘式加液模式

ELEX 6361 测定参数

Eppendorf 的 ELEX 火焰分光光度计分析 Li 元素时采用去离子水作为零点的空白对照，100、250 和 500 ng/ml 的 Li 溶液作为标准品，500 ng/ml 的 Li 溶液是用于信号放大的检测。本实验中采用乙炔作为消耗燃气，671 nm 标准 Li 滤光片，0、2、5 和 10 ng Li/ml 的溶液作为对照。火焰分光光度计为 ELEX 6361。测定 Li 元素的其他方法也可采用同检测灵敏度的原子吸收或 ICP 等仪器。在临床化学上用火焰分光光度计应用的所谓“Li 药物监测”的方法不适用于这里的污染测试。

结果

在 384 孔板中只有 2 个孔内的信号显示出含有 2 ng Li/ml (2 ppb)，表明污染程度只有约 30 pI，污染样品比例只有 0.52%。

这种微小液滴的污染程度不会对样品产生影响也可以从 PCR 的结果中很明显的看到。在同样条件下进行 PCR 反应，凝胶电泳图的分析表明（图 3）没有污染条带。

从以上结果，我们可以看到在没有真实污染的情况下用 epMotion 5070/5075 自动移液工作站进行移液操作是可以有效避免交叉污染的。

参考文献:

- [1] H. Specker and H. Kaiser "Zeitschrift für Analytische Chemie" Vol. 149; 1956
- [2] Frank Apostel, Eppendorf BioNews 20

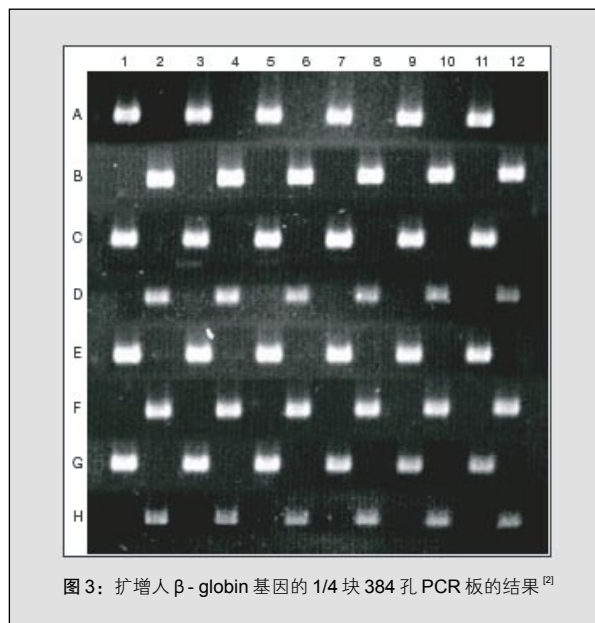


图 3: 扩增人 β -globin 基因的 1/4 块 384 孔 PCR 板的结果^[2]

作者 Renate Fröndt, Eppendorf AG, Hamburg