

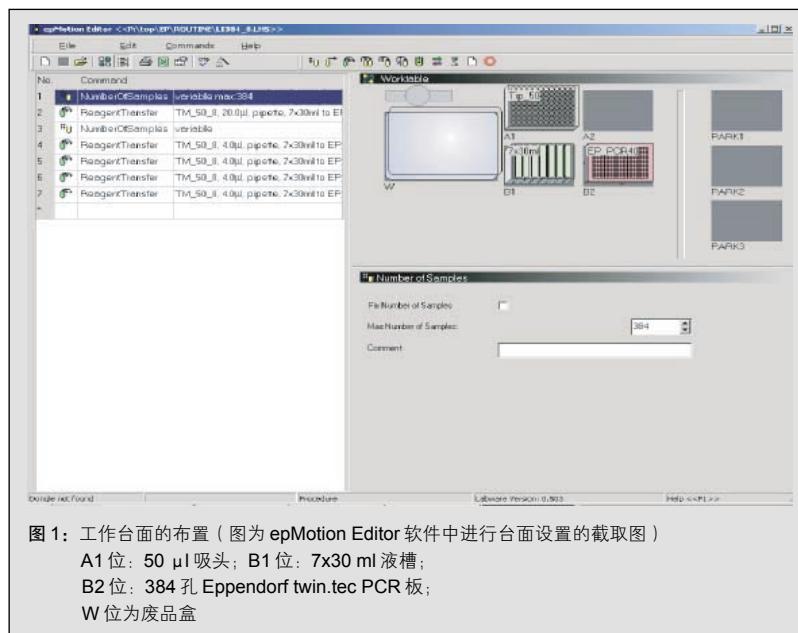
epMotion 5070/5075 自动移液工作站的污染测试

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 孔这种棋阵式布局的反应板中，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 孔棋阵式布局的反应板中，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 $0.1 \text{ nL} (= 6.1 \text{ ng} \text{ Li})$ ，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 $1 \text{ ng Li/ml} (= 1 \text{ ppb Li})$ ， 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 $61,000,000 \text{ ng Li/ml} = 61 \text{ ng Li/nL}$ ）。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。反而言之，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 $6,100,000 \text{ ng/ml} (= 6.1 \text{ ng Li/nL})$ 。稀释液为去离子水。

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一些预编程序，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。

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 pl，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 2：384 孔 Eppendorf twin.tec PCR 反应板的棋阵式加液模式

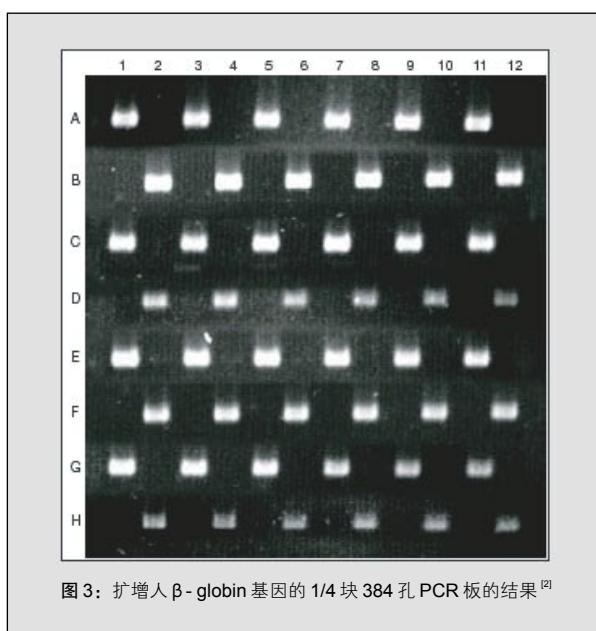


图 3：扩增人 β -globin 基因的 1/4 块 384 孔 PCR 板的结果^[2]

作者 Renate Fröndt, Eppendorf AG, Hamburg