

# 快速设置高通量 PCR 小型自动移液工作站

## —— epMotion® 5070

### 告别繁琐，紧张的移液工作

经常用 96 孔或者 384 孔板作 PCR 实验，或者经常处理酶标板的工作者，一定会体会到，作此类试验需要注意力高度集中。时间长了，感觉精疲力尽。

在操作此类试验的时候，经常发生一些失误。比如，换完吸嘴以后，忘记了第 23 栏孔是否已经加好引物？从而不知道是从 22 栏开始，还是从 23 栏开始？有了 epMotion® 5070 小型自动加样工作站，就不会再出现诸如此类的问题。7分钟的时间，就可以将实验需要的试剂，如 HotMasterMix，分子生物学级别的纯净水，或者 96 种不同的样品等加入到 96 孔板。如果是 384 孔板，可能需要 21 分钟，这是因为 epMotion 5070 是一台小型的加样工作站。假如是将同一种样品分到 96 孔，整个过程只需 2 分钟！

### 不再乏味

最值得庆幸的是，无需担心加样重复性，也不用再为忘记加样次序的问题烦恼。从此这种乏味的，但又必须不断重复的工作，交给 epMotion 了，不仅自动化程度高，而且结果可靠。

### 完美组合

自动加样工作站可以应付所有的重复加样工作，这是毫无疑问的。如果配合 Eppendorf 其它产品如试剂和耗材，即可为 PCR 实验提供一个完美的实验条件。

如采用 Eppendorf 的 HotMasterMix 即用型试剂盒作热启动的 PCR 反应，这种情况是非常适合自动加样工作站处理。因为 HotMaster 热启动酶可以储存在普通的冰箱中，无需事先解冻，而且该试剂盒可以长时间置于工作台中，无需冷却。其热启动性能特征防止酶与其他成分的预反应。

原因是 HotMaster 试剂盒有专利的 Hot Start / Cold Stop 技术，可以在整个 PCR 循环过程中达到热启动 / 冷终止的效果。有别于其它传统的热启动试剂盒。而其它品牌的热启动酶，经 95°C 孵育激活后，不能恢复低温时阻断 Taq 聚合酶的功能。而且使用该试剂盒，无需摸索合适的镁离子浓度，因为 MasterMix 的缓冲液系统具有自我调节镁离子浓度的功能，可以适合各种 PCR 的反应条件。



96, 384 twin.tec PCR 板尤其适合自动加样系统，符合 SDS 标准。twin.tec PCR 板的边缘是聚碳酸酯材质，薄壁孔壁是聚丙烯材质。这样的材质和制作工艺，可耐受高温和机械的压力，实验偏差小。

自动加样对吸嘴的材质和形状要求很高。epMotion 专用的吸嘴 epT.I.P.S® 放置于无污染的吸嘴盒，且分为优质级和 PCR 洁净级两种不同纯度的吸嘴套装。根据实验需要，还可以选择有滤芯和无滤芯的吸嘴。

下面我们提供一篇应用文章，从中你可以体会到这一系列新产品将为一个精确和无污染的 PCR 反应提供一个完美的组合。

## 前言

20年前 Kary Mullis 发明了聚合酶链反应 (PCR)，在生命科学研究和医药多个应用领域引起了重大的变革 [1]。从那时起，这种 DNA 复制新技术就不断在发展。

最新的例子，就是应用到重症急性呼吸道综合症 (SARS) 的检测。借助聚合酶链反应，准确无误地检测到冠状病毒病原体 [2]。

PCR 反应特征需要特殊的条件和技巧。实际工作中，PCR 可以扩增 10–100 个 DNA 分子，这种高灵敏性和特异性的 PCR 仍旧具有很高的应用价值。进行 PCR 反应时，需要特别注意的，如独立设置 PCR 反应前区域与 PCR 反应后区域，最好采用有滤芯的吸嘴，需要设置阳性和阴性对照反应。

准备 PCR 反应要特别小心，最好是在专门的反应前区域里操作。在这样的环境里处理 DNA 样品和相关的耗材，可以避免假阳性反应。PCR 反应样品的准备和加样过程在整个 PCR 反应是非常重要的操作。

96 孔或者 384 孔的 PCR 反应，需要的液体量非常少。因此手工加样操作是很难保证每孔加样的准确性和精确性。384 孔板孔间的距离只有 4.5 mm，因此对加样者的熟练度要求非常高。只有自动化的加样工作站才能确保如此微量加样的可靠性。这篇文章讲述了用 epMotion<sup>®</sup> 5070 简单、无污染地处理 384 孔板 PCR 反应的过程。

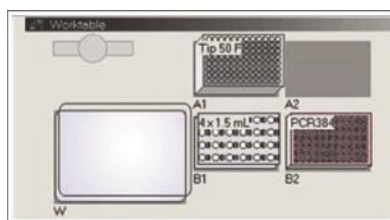
## 实验的建立

工作站的工作桌面采用 50  $\mu$ l 带滤芯的吸嘴 (ep T.I.P.S<sup>®</sup> Motion 50  $\mu$ l, 带滤

芯)，装载 1.5 ml Safe-Lock Eppendorf Tubes<sup>®</sup> 的热管托架 (Thermorack)，装载 384 孔 PCR 板 (Eppendorf twin.tec PCR plate 384) 的温控托架 (thermoblock) (图1)。

PCR 试剂采用 Eppendorf 的 HotMasterMix，所以无需冻存反应试剂和 PCR 板。

使用 384 孔板的温控模块的目的，方便热封封口膜。



● 图1：工作桌面的设置

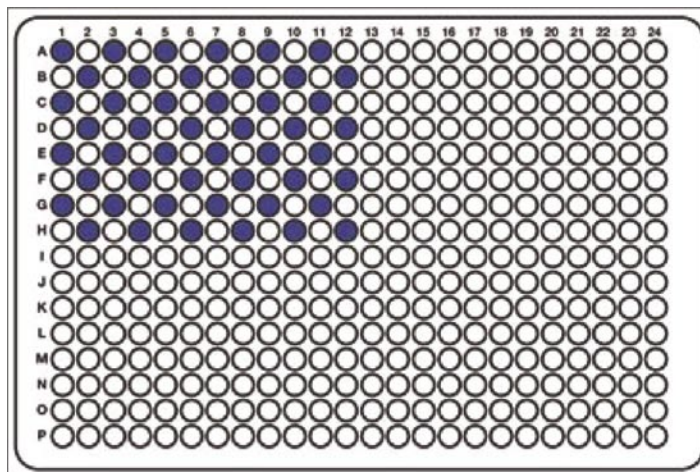
位置A1：50  $\mu$ l 带滤芯的吸嘴

位置B1：容纳 24 个 1.5 ml Safe-Lock 管的热管托架

位置B2：放置在温控托架上的 384 孔 twin.tec PCR 板

No.	Command
1	NumberOfSamples fixed, 96
2	ReagentTransfer ts_50, 5.0 $\mu$ l, multidisp, 4tubes to 384 PCR
3	ReagentTransfer ts_50, 10.0 $\mu$ l, multidisp, 4tubes to 384 PCR
4	NumberOfSamples fixed, 24
5	ReagentTransfer ts_50, 10.0 $\mu$ l, multidisp, 4tubes to 384 PCR
6	ReagentTransfer ts_50, 10.0 $\mu$ l, multidisp, 4tubes to 384 PCR
7	ReagentTransfer ts_50, 10.0 $\mu$ l, pipette, 4tubes to 384 PCR
8	ReagentTransfer ts_50, 10.0 $\mu$ l, pipette, 4tubes to 384 PCR

● 图2：PCR 自动加样的程序。只需要设置 8 条命令。



● 图3：加样图案。384 孔板加入了 96 个 PCR 反应物。其中 48 孔 (蓝色标记位置) 含人基因组 DNA，另外 48 孔作为阴性对照，含有 PCR 反应物除 DNA 以外的所有成分。

下列样品需要加入 384 孔板：

人类基因组 DNA (5 ng /  $\mu$ l)  
分子生物学级别纯净水 (Eppendorf)  
引物混合物 (每种 1  $\mu$ M)  
2.5  $\times$  Eppendorf HotMasterMix  
(热启动试剂盒)

需要按照特殊的移液模式，所有的分液工作都是由 epMotion<sup>®</sup> 单道分液工具 (TS 50) 完成，因为每根 Safe-Lock 管要加试剂。

epMotion 非接触式光学感应器确定了所有液体的液面高度。光学感应器还负责识别和确认选择配置的类型，吸嘴的数量以及吸嘴盒的类型。

在 384 孔板内准备 96 个 PCR 反应，检测人  $\beta$  球蛋白基因片段。所有的加样步骤均由 epMotion<sup>®</sup> 5070 完成。

第一步，每个孔内加入 5  $\mu$ l 引物混合物 (每种引物最终浓度 0.2  $\mu$ M)。有义链引物 (5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3')，反义链引物 (5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG-3') (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany)，用于扩增 535 bp 人  $\beta$  球蛋

白基因。随后在每个反应里加入10 μl 2.5× HotMasterMix (Eppendorf)。25 μl反应体系中包括人类基因组DNA (终浓度 2 ng/μl, Roche, Pleasanton, CA, USA), 或者是分子生物学级别纯净水 (Eppendorf), 作为阴性对照。图2显示整个加样过程。

反应物加入 PCR 板, 形成一个棋格状图形 (图3)。

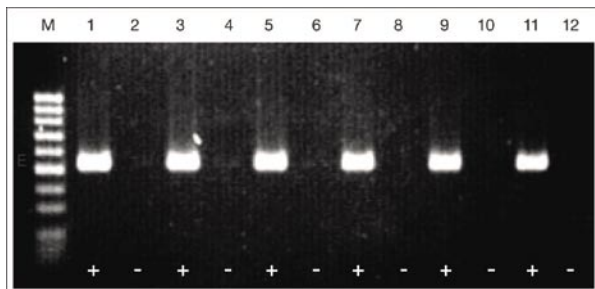
加样完毕后, 用Peel-it-lite (Eppendorf 热封膜) 热封。用 Eppendorf Mastercycler® ep PCR 仪按照下列程序运行 PCR 反应。

	94° C	2 分钟	起始变性
30个循环:	94° C	30秒	变性
	60° C	30秒	退火
	65° C	30秒	延伸

反应后产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

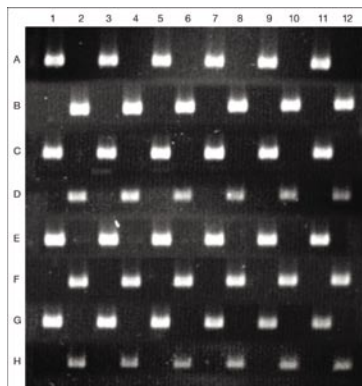
### 结果和讨论

图 4.1 清晰地显示了用人 DNA 为模板的 535 bp 人 β 球蛋白基因扩增产物。电泳分析未检测到 PCR 非特异性产物, 并显示了所有 β 球蛋白基因片段阳性反应产物 (含 DNA)。观察所有的 96 个 PCR 反应, 同时进行的 48 个阴性对照均未有 PCR 产物产生 (图 4.2)。



● 图4.1: 535 bp 人 β 球蛋白基因扩增结果  
M: DNA marker (100 bp ladder)  
E行12个反应物用1%琼脂糖凝胶电泳分析。  
(+) = 含人DNA, (-) = 不含人DNA。

自动加样工作站可以更换的吸嘴以及无散射 (free jet) 完全创新的分液技术是取得上述结果的保障。45年前 Eppendorf 公司发明的气压式移液技术保证了无接触, 无污染加样过程, 处理液体体积可精确至 μl。无散射的分液特点避免额外的混合步骤, 节省时间和吸嘴的用量。



● 图4.2: 96个PCR反应电泳结果:  
在 384 板1/4板进行的 535 bp 人 β 球蛋白基因扩增反应。为了更清楚地阐述结果, 按照图3的模式, 分割了 PCR 板 A-H 行的图像。

上述结果表明, 小型化, 灵活性的自动加样工作站epMotion® 5070完全可以很轻松完成诸如 384 PCR反应之类的加样工作, 结果可靠, 且具重复性, 简化分析系统, 不会造成样品间的污染。

### 其他应用

上述试验只是一个应用于高通量PCR的例子。事实上, 小型加样工作站还有更广泛的应用领域。

1. 定量 PCR。此类的实验不同于定性 PCR 反应, 对样品处理需要更高的精确度和准确度, 以避免由于加样的实验误差, 而造成假性的高反应产物。配合定量PCR, 可以保证反应结果的可靠性。
2. 酶标反应。由于可更换的吸嘴, 可以避免传统的管道式加样导致的反应物的污染。
3. 荧光和化学发光高通量检测蛋白。配合读板式的荧光和化学发光高通量的蛋白检测仪, 更高效率、更准确地定量蛋白质。
4. 基因工程等, 如可以将需要的细胞或者细菌克隆从 24 板或者其他的培养中取出, 按照自己设计的次序, 重新排列克隆。
5. 生物制剂或者生物制药中试试验。

由于 epMotion 5070 不仅可以处理板与板之间的加样工作, 还可处理管与板, 或者玻璃试管与离心管等其他大多数自动加样工作站无能为力的特殊加样工作, 所以其应用可涉及更广的范围。

综上所述, epMotion® 5070 这台小型的加样工作站完全可以胜任复杂而繁琐的加样工作, 而且可靠性更高。为实验室或者中试车间提高实验数据的稳定性、准确性和精确性, 提供一个合适的, 优秀的助手。