

LightCycler® 480 系统：高通量定量 PCR 快速精准的新标准

Christian Weilke, Gudrun Tellmann, and Michael Hoffmann*

罗氏应用科学部·匹兹堡·德国·

*联系作者: michael.hoffmann@roche.com

简介

LightCycler® 480系统是一个全新的可用于核酸定量和定性以及分型检测的模块式定量PCR平台,它是特别为全自动高通量检测而设计的。该系统与基于毛细管技术的LightCycler® 1.5和LightCycler® 2.0开放系统相类似的是,LightCycler® 480系统也是一个通用的开放平台,可提供精准和高重复性的结果,融合了LightCycler®系列一贯的高灵活性和快速的特点。

实现 qPCR 的精准性

在PCR循环过程中,目标温度控制的精准程度是快速和高重复性结果所必需的。LightCycler® 480系统,通过在加热模块中添加了创新的“Therma-Base™”从而实现了孔板的每个样品位都能同时快速的达到目标温度。“Therma-Base™”是一个热传导和温度平衡的装置,位于狭小真空腔中的工作液体通过蒸发和凝聚的转换而进行工作(图1)。量身打造的96-和384-孔板和相应的加热模块的完美契合是反应混合物快速能量传输的前

提。插入的加热模块上方有一个热盖,防止反应腔上部的液体凝集。

光学系统由一大组特殊的精准透镜和冷 CCD 照相机组成,它们可以均一的进行荧光检测,同时保证了整板检测的高灵敏度。两套自由组合的滤镜方便实现不同荧光染料(500-670 nm)的特定激发和检测。巧妙地使用镜子,使光路发生了折叠,从而实现了仪器构造的紧凑化。

含有热启动酶的即用型试剂是LightCycler® 480系统精准的另一重要因素。针对每一种实时定量PCR的应用,酶和缓冲液条件都被仔细的选择和优化;即便是在快速流程下也能得到很好的和高灵敏度结果。

在数据分析上,LightCycler® 480系统包括有高准确性和灵活性的软件模块。基于无偏差的Cp二级导数计算方法和非线性标准曲线算法,LightCycler® 480的基本软件提供了无可比拟的定量分析方法。LightCycler® 480

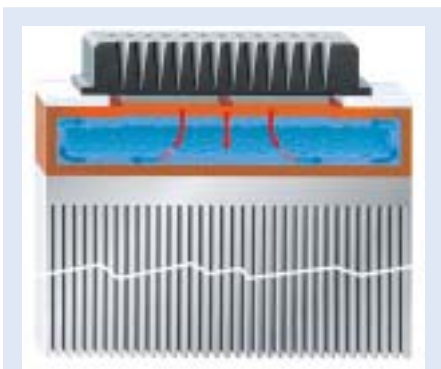


图 1: LightCycler® 加热模块的切面观。上层:多孔板放置处;中层:Therma-Base™;下层:降温设备

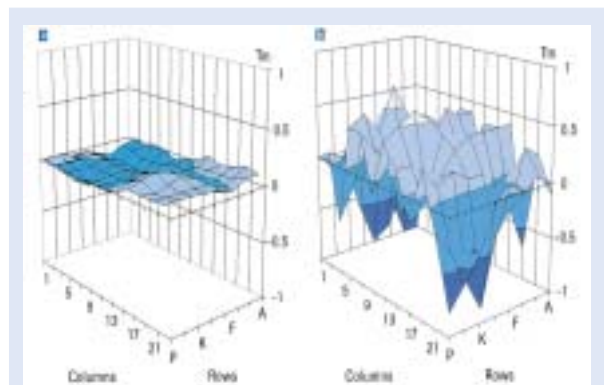


图 2: 通过测定溶解温度检测加热模块的精确度
(a) 有Therma Base™的LightCycler® 480加热模块
(b) 无Therma Base™的其它的实时荧光定量PCR
已知的寡核苷酸/单探针二聚体的熔点温度(T_m)被作为灵敏度检测的参数来检测多孔板的温度均一性。以预期T_m值(50°C)为0,该图显示了检测的T_m值与预期的T_m值之间的差值。

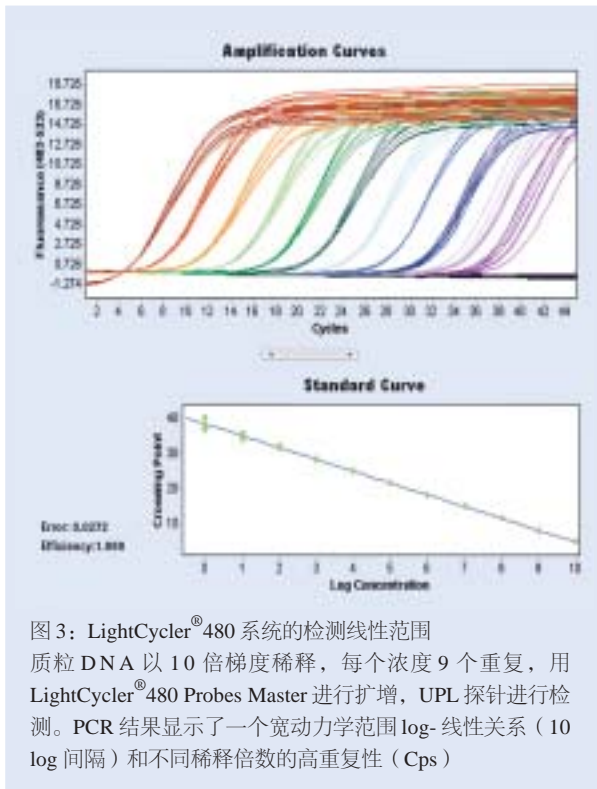


图 3: LightCycler[®] 480 系统的检测线性范围
质粒 DNA 以 10 倍梯度稀释, 每个浓度 9 个重复, 用 LightCycler[®] 480 Probes Master 进行扩增, UPL 探针进行检测。PCR 结果显示了一个宽动力学范围 log- 线性关系 (10 log 间隔) 和不同稀释倍数的高重复性 (Cps)

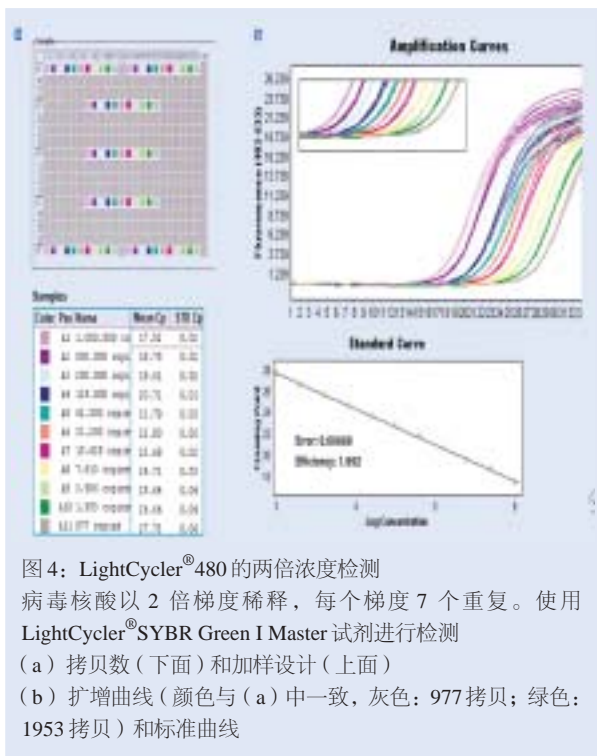


图 4: LightCycler[®] 480 的两倍浓度检测
病毒核酸以 2 倍梯度稀释, 每个梯度 7 个重复。使用 LightCycler[®] SYBR Green I Master 试剂进行检测
(a) 拷贝数 (下面) 和加样设计 (上面)
(b) 扩增曲线 (颜色与 (a) 中一致, 灰色: 977 拷贝; 绿色: 1953 拷贝) 和标准曲线

的相对定量软件进一步的将 PCR 的扩增效率考虑在内, 并且提供了基于校正品的实验方法 (如, 比较目的基因和内参基因)。

qPCR 精准性的演示

如上所述, 温度均一性是多孔板 qPCR 重复性的一个重要前提, 熔点分析 (T_m) 提供了一个有力的高灵敏度的检测方法 (图 2)。相同的反应混合液 (一段可与 SimpleProbe 互补的寡核苷酸) 加入到板上不同位置的孔中; 温度以恒定的速度缓慢升高时, 检测荧光信号。在反应混合液的特定溶解温度, 荧光信号的降低将达到最大。在溶解过程中, 只有当板子上的每个地方的温度同时达到同样的数值时, 才可能得到 T_m 的高重复性 (图 2a)。从另一方面来说, 不均一的温度将导致熔点温度高于或者低于期望值 (图 2b)。

qPCR 精准性的好处

LightCycler[®] 480 系统的高重复性设计, 使得其批内和批间的检测差异性很小。当把稀释的重复样品放在板子的不同区域时 (walk-around-the-block 实验), 可以看到甚至是低浓度的待测物都可以得到高重复性的扩增曲线。如图 3 所示, 该系统可以可靠的检测和定量 10⁰ 至 10¹⁰ 拷贝的目标基因。在这个动力学范围内, 仅有两倍的浓度差别就可以进行区分 (图 4)。

通过两类实验, LightCycler[®] 480 系统表现出了出众的分辨率、灵敏度、重复性和 PCR 数据的均一性 (Cps)。重复性表现在重复组的 C_p 高度一致和低的标准差。

因为荧光检测并不依赖于样品在板上的位置, 反应体系中没有必要添加内参染料 (如 ROX) 进行校正。

总结

正如其每个组分 (硬件, 软件和试剂) 的特点和实验数据所示, LightCycler[®] 480 系统作为一个整体, 是精准的, 高重复性的实时 PCR 的最佳选择。

由于 LightCycler[®] 家族的实时定量 PCR 系统的出现, 实时 PCR 检测速度和精确度的概念在若干年前已经被罗氏应用科学部彻底更新了。目前, LightCycler[®] 480 这一新的 PCR 平台为 LightCycler[®] 系统更是提供了一个独一无二的组合, 该组合结合了精确性、速度和多孔板式的检测模式, 可以进行 96 孔或者 384 孔的检测, 同时可以实现所有相关的 qPCR 应用。