

评估 384 孔微孔板混匀效率的一种新方法

概述

对于 384 微孔板的格局来说,想要得到最佳的混匀效果是比较难的。通常混匀效率都是通过肉眼观察来确定。我们的研究认为,这种主观的定性的测定方法,往往不能得出最佳的结果,甚至得到错误的结论。因此,我们提出一种量化的手段,利用双染料光度法,使得用户可以对混匀设备进行混匀效率的测定。

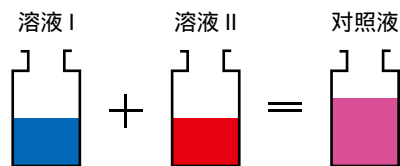
为了测定最理想的混匀状态,需要在测试孔板内分别加入两种溶液,然后进行预定的混匀程序。另外使用预先混匀的溶液作为对照液来剔除非混匀因素带来的偏差。通过测定两种溶液的平均吸光率、标准偏差和变异系数(CV),计算多次混匀的数据结果,就可得到混匀效率的数据。我们采用上述的新测量方法,测定了 384 孔微孔板中未被混匀和完全混匀后的数据。



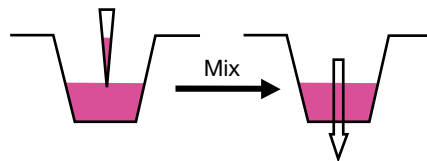
方法

对照液

向测定板的一部分孔内加入 55 μl 预先混匀的对照液。此对照液是在分配到测定板之前就混匀好的。包含两种染料,与测试溶液的浓度相同。由于两种溶液的蓝色染料浓度是一样的,所以可以以此作为参照。



分配预混合的对照液 用光度计测定



目的

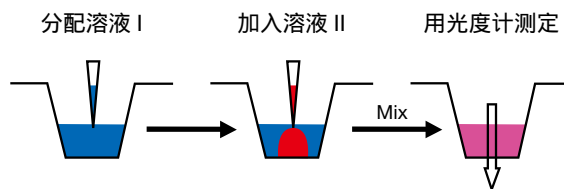
论证用肉眼观察来判断混匀效率是不够的
推荐一种通过双染料光度法来量化混匀效率的方法
介绍该方法及相关试验数据,在某种意义上可用于混匀器及工程样机在实验环境下的混匀效率的测定

材料

溶液 I (MVS® Diluent, ARTEL), 含有不挥发的已知浓度的蓝色染料
溶液 II (MVS® Range C, ARTEL), 除含有与溶液 I 相同浓度的蓝色染料外还含有已知浓度的红色染料
用于测量在 520 nm & 730 nm 的吸光率的平板读取器 (Bio-Tek, ELx800nb)
384 孔平底、未处理的黑色聚苯乙烯测定板 (Corning, #3711)

样本

往一部分测试孔内加入 53 μl 的溶液 I
使用多通道吸液管吸取 2 μl 的溶液 II, 加入到已有 53 μl 溶液 I 的孔内
在测试板上剩余的孔内加入 55 μl 的溶液 I, 保证混匀过程中孔板平衡
分别测试溶液的初始 / 混匀前吸光度, 在表格上对应为“测试 0”点的值



测定完初始值后，将该测试板放置在需要测试的混匀设备上运行预先设定好的混匀程序。当混匀停止后重新测定一次。为混匀/测定的一个过程设定一个测试序号。

每次需测定两个波长段下的平均吸光度、计算每个测试孔和对照孔标准偏差和变异系数（CV）。这种分析包含了两种溶液中以对照液的形式体现的参照标准。因此该数据可以反映出混匀器或混匀程序的混匀效率。

因为对照液在被分配到微孔板内之前已经被混匀，所以平均吸光率和 CV 值在多次的测试中都将基本稳定在同一水平。对照液的数据会由于客观存在的损耗（比如蒸发和洒出）而产生变化。所以并不需要苛求最后测出的对照液和样品的吸光率能保持在某个点上不发生变化。

加了溶液 II 的测试孔内的最初平均吸光度和 CV 数值跟对照液相比通常差距会很大（尽管用肉眼观察与对照液的差距可能很小）。这是由于溶液 II 中的红色染料集中于管中心的缘故。混匀后，测量值将会有新的变化。因为红色染料通过混匀均匀分散，所以吸光率将改变，而 CV 值是相对离散度的体现，所以将减小。如果两种溶液已经达到最佳混匀状态，再次混匀，溶液的吸光度也不会产生明显改变。

某些情况下，所设定的混匀参数并不能通过一次混匀就达到最佳混匀效果。用肉眼判断可能觉得已经完全混匀，然而，继续混匀后测量值可能改变较大，说明通过肉眼判断是不可靠的。每次的重复混匀操作后，测量值可能变化或保持不变。当测量值不再变化时就说明已达到最佳混匀效果。

示例

未完全混匀

使用前文所述的方法，测定某混匀器的最佳混匀状态

该方法中的混匀参数（60 s 混匀时间，混匀频率为 3,100 rpm）是随意选择的

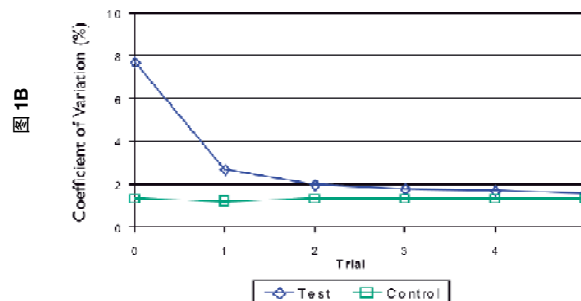
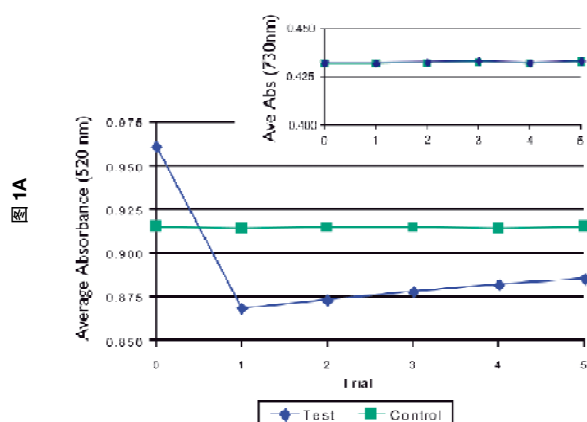
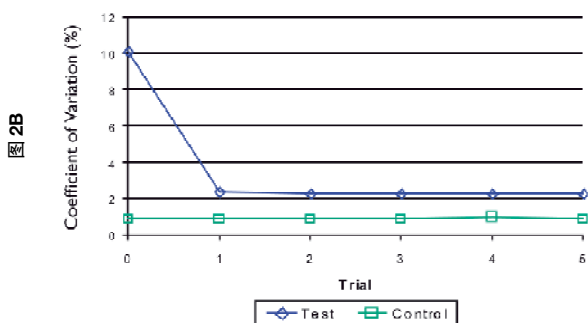
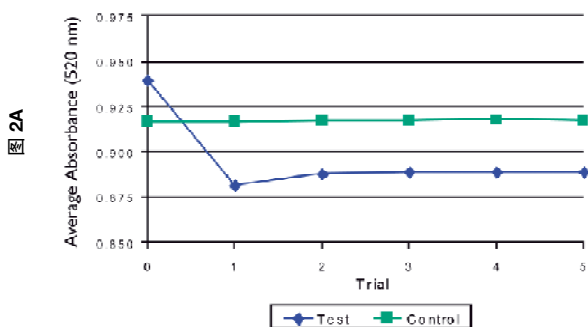


图 1A 中，在每次混匀步骤后的测试点得到的测试孔的平均吸光率最后没有达到一个稳定的数值。图 1B 中显示的是 CV 数据曲线，在一次的测试中 CV 值持续减小，但是经过五次混匀最后仍然没有趋于稳定。这说明溶液还未达到最佳混匀状态。

插在图 1A 中的那组 730 nm 的数据，给出了理想化的测试液和对照液的曲线（两根线重叠在一起）。平坦的平均吸光率曲线说明溶液在分配到测试板时的操作非常完美。另外，也说明了测试溶液没有受到其他因素的影响（比如泼洒、液面变化、气泡导致的移液不均等）。

完全混匀

根据第一次实验的结果,对同一混匀设备进行了第二次测试,在这次测试中,混匀频率被提高到 3,750 rpm



在图 2A 中,平均吸光率的数值在第二次混匀后基本达到稳定状态。对照液的值在几次混匀中都没有变化。图 2B 中 CV 值也达到一个稳定的水平。这说明两种溶液在该混匀设备及该条件下经过两次混匀后达到了最佳的混匀状态。

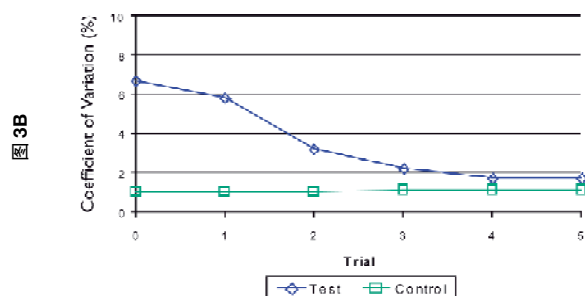
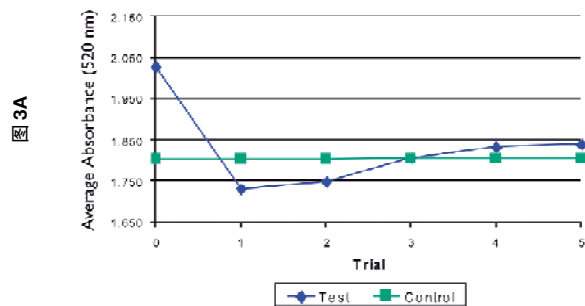
混匀效率

Eppendorf MixMate 混匀小精灵

测试“384”按键内置的标准混匀参数,混匀时间 15 秒,混匀速率 2,000 rpm。

对照液孔数: 48, 测试液孔数: 64。

平均孔板重量 ~ 88g。



Eppendorf MixMate 混匀小精灵在预议的参数下达到了稳定数值(图 3A,3B)。

通过目测判断, MixMate 混匀小精灵在三次混匀后,溶液达到最佳混匀效果。而通过光度计测定,则在经过四次混匀后达到最佳混匀效果。

在以上预置参数下, MixMate 经过四次混匀(60 秒)达到最佳混匀效果。因此,可以设定时间参数为 60 秒,就可确保溶液被充分混匀。

结论

以上讨论的方法通过量化试验对混匀效率进行测量和评价。这种方法相对于广泛使用的目测或者高速摄影来判断混匀效率的常规方法来说是一种提高。对照液的引入可以记录其他非混匀因素的影响。此外,内部参照物(蓝色染料)在样品和对照液中同时存在,可由此计算影响测量结果的因素。比如气泡的破裂会改变光程长度,溶液溅出造成的损耗和液柱的弯液面的变化。内部参照物的引入可以通过分析修正和消除这些混匀过程中的影响。

虽然本次试验仅针对 384 孔板,但是该方法对于 96 孔和 1536 孔的孔板同样适用。此外,该方法也可用于测定带有自动移液器的混匀标准程序以及倍比稀释分析法的混匀效率。总而言之,如果没有彻底有效地混匀,试验方案及仪器就可能产生不正确的试验结果。而前面所介绍的这种方法提供了量化的指标保证了实验结果的可信度及完整性。

作者 BENJAMIN W. SPAULDING
JOHN THOMAS BRADSHAW
ALEXIS L. ROGERS