

Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统 成功实现小体积扩增检测

摘要

近来,随着荧光定量 PCR 技术的快速发展,极大地改善了定量扩增的运行时间和结果重复性。本文的研究涉及,使用 Eppendorf Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统实现小体积扩增检测,并评估结果的重复性。

前言

由于基因组学的研究成本昂贵,通过尽可能减少试剂的用量来降低成本就显得尤其必要。在定量 PCR 技术的运行成本中很重要的一块试剂消耗就是 MasterMix,它包括 dNTP、PCR 酶、镁离子和稳定剂。此外,另一块重要的组成就是反应模板,这些用于扩增的 DNA 或 RNA,购买非常昂贵,自己制备与纯化过程非常耗时且批间差异大。如此算来,25 μ l 的反应体系已经非常奢侈了。当然,我们还需要考虑降低定量 PCR 结果的变异性,这些往往是由于操作者的移液操作误差所造成,也正因为此,引入全自动移液工作站可以很好地改善 PCR 结果的重复性。

在保持反应体系中各组成浓度相同的前提下,减小反应体系的体积不失为减少试剂用量、降低成本的好办法。然而,小体积的反应体系也会引起许多问题,这些问题都会直接导致 PCR 反应效率降低,极大影响 PCR 定量的质量。其中,挑战最大的莫过于小体积很容易造成 PCR 反应孔壁上挂液与蒸发,导致反应体系间试剂浓度变异。为了克服移液误差造成的体积变异,可以使用 ROX 校准染料。可是,由于小体积体系中发生蒸发是无法控制的,每批蒸发程度的重复性也无法控制,因而 ROX 是无法补偿这类原因造成的关键因子的浓度变异。另外,仪器运行定量 PCR 实验一般需 1 个半到 2 个小时,其间的蒸发现象是无法根除的。鉴于实验时间越长热量的吸收越大,小体积扩增时必须运行尽量短的时间。

方法与材料

实时荧光定量 PCR 实验

所有实验都在 Eppendorf Mastercycler ep *realplex* S 实时荧光定量 PCR 系统银制模块上运行, RealMasterMix 含酶预混液、SYBR Green I 与引物对用于扩增检测 *-actin*、两个小鼠基因及 LamdaDNA 104 bp 片段; RealMasterMix Probe 含酶预混液、引物对、标记有 Cal Fluor Gold 540 与黑洞淬灭染料的探针 (Biosearch Technologies) 用于扩增检测 DNA。所有反应的液体操作均在 Eppendorf ep*Motion* 5070 自动移液系统上完成,分液至 Eppendorf twin.tec 96 孔 PCR 板,使用 Eppendorf 热封膜与热封仪封板。对照组选用的是 20 μ l 反应体系。



Eppendorf 最新推出 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统用于广大科研市场,本文数据来自于三个小鼠基因与 LamdaDNA,使用 SYBR Green I 染料和 TaqMan 探针,5 μ l 反应体系。

Eppendorf ep*Motion* 5070 自动移液系统,已经在科研与制药业实验室用于小体积液体准备,以增加实验通量与降低成本。由于自动移液系统很好控制了移液的随机误差,所以保障了实验的准确与重复性。

本文的实验设计,将自动移液系统与灵敏、快速的实时荧光定量 PCR 系统结合,成功实现 5 μ l 小体积扩增检测,此外,与更大体积的体系相比,PCR 效率与相关性基本一致。

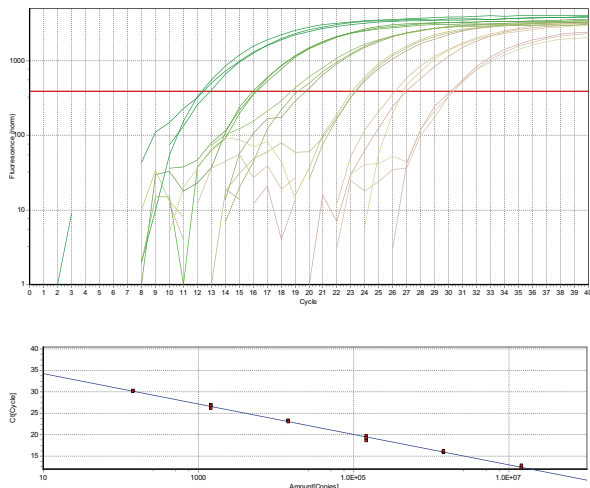


图 1：CAL FLUOR Gold 540 标记的 TaqMan 探针分析

上方图示：每孔 5 μ l 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 DNA 104 bp 片段。模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶预混液，正向与反向引物终浓度取 400 nM，CFG450/BHQ-1 标记的探针终浓度取 400 nM，50 个循环，运行 43 分钟。

下方图示：根据上方 TaqMan 探针分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.552，Y 轴截距 = 37.89，
扩增效率 = 0.91，相关系数 = 0.998

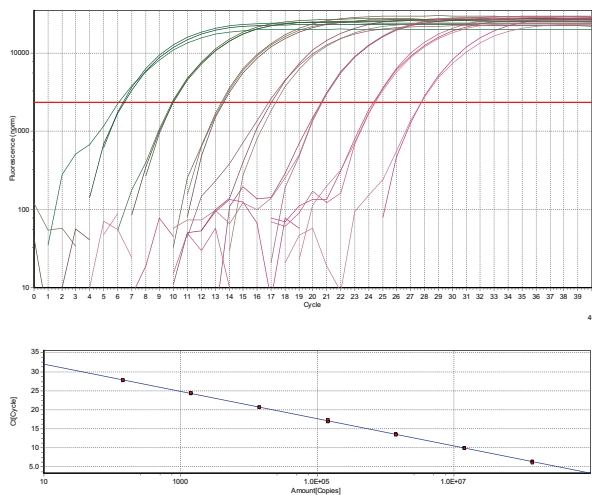


图 2：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μ l 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 DNA 104 bp 片段。模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 400 nM，50 个循环，运行 43 分钟。

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.591，Y 轴截距 = 35.61，
扩增效率 = 0.90，相关系数 = 1.000

反应液体准备 —— SYBR Green I 分析

每个定量 PCR 反应均运行三重复管，用做模板的人基因进行三级倍比稀释，最小到 142.5 拷贝。PCR 热程序为初始变性 2 分钟，接着两步法 95 变性 60 秒，退火延伸，40 个循环。

CAL FLUOR Gold 540 标记的 TaqMan 探针分析模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，从 1.42×10^7 到 142.5 拷贝。PCR 热程序为初始变性 2 分钟，接着两步法 95 变性 60 秒，退火延伸，40 个循环。

结果

TaqMan 探针 5 μ l 体系定量分析，标准曲线线性范围跨越 6 个数量级。在同样 5 μ l 小体系 SYBR Green I 分析中，无模板对照扩增管出现了引物二聚体（未显示熔解曲线），由于 SYBR Green I 自身本底的干扰，对单拷贝模板的定量并不可靠，但是，标准曲线线性范围跨越 7 个数量级，最小至 14 拷贝。

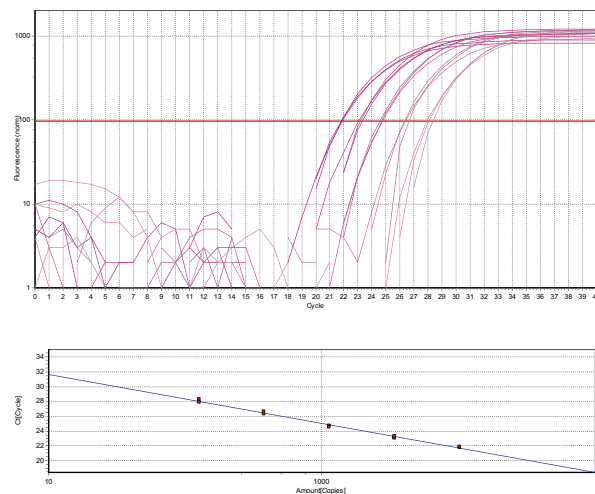


图 3：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μ l 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 G469 bp 片段。模板小鼠基因组 DNA (Promega) 进行 3 级 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 300 nM，45 个循环，运行 41 分钟。

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.309，Y 轴截距 = 34.96，
扩增效率 = 1.01，相关系数 = 0.994

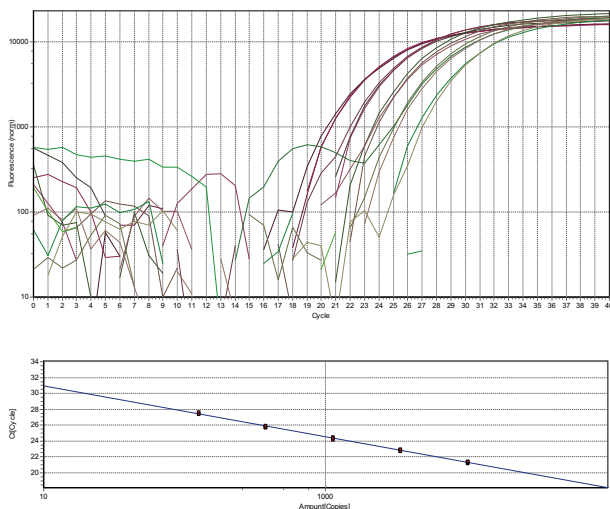


图 4：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μl 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 G171 bp 片段。模板小鼠基因组 DNA (Promega) 进行 3 级 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 300 nM，45 个循环，运行 41 分钟。

阈值：1568 (系统设置)

基线：自动

漂移校正：关闭

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = -3.207, Y 轴截距 =34.13, 扩增效率 = 1.05, 相关系数 =0.996

基线：自动

漂移校正：关闭

小结

通过与 20 μl 反应体系 (未显示) 的对比, 5 μl 小反应体系扩增的效率与相关系数与之相当。虽然, 蒸发是小反应体系扩增最大的挑战, 但 Eppendorf 银制超速模块却很好地克服了这个。它可以在 25 分钟内完成 40 个循环, 而原来同样的循环可能需要 40 分钟。

Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统实现的热传导是基于拥有专利的“三组回路”技术, 它意味着有六块 peltier 元件在模块内部精确温控。另外, 用于荧光激发的 96 个 LED 光源直接位于反应模块的上方, 保证每一孔都最大、最一致的激发。市面上很多定量 PCR 仪的光源采用的都是白炽灯位于反应模块正中的上方, 对于普通 25 μl 反应体系很容易发生由距离因素造成的荧光激发 / 检测的“边缘”效应。当将反应体系降到 5 μl 这样的小反应体系时, 边缘效应所造成的危害将更为显著, 影响结果的一致性。

为了保证有效地捕捉荧光信号, Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统采用 96 个光纤同步采集信号并传送至通道式光电倍增管, 这是目前最灵敏的荧光检测器。

我们有理由相信, 5 μl 小反应体系定量扩增获得如此满意的重复性, 在很大程度上得益于 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统优秀的光路设计、灵敏的荧光检测和均匀的热传导。此外, 缩短了运行时间也很好解决了样品蒸发的。

通过使用 Eppendorf epMotion 5070 自动移液工作站完成液体准备工作, 加上 Mastercycler ep *realplex* 荧光定量 PCR 系统优异的性能, 成功地将定量 PCR 的反应体系降至 5 μl 小体积。比常规的 25 μl 体系压缩了将近 80%。这将意味着试剂成本实实在在的降低。

当我们需要操作高通量基因表达分析时, 压缩试剂成本带来的好处是显而易见的, 另外, 由于 Eppendorf 银制超速模块可以在 25 分钟内完成 40 个循环, 使实验时间也大幅压缩。因而, Eppendorf epMotion 5070 自动移液工作站与 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统的组合是您从事定量 PCR 研究省时、省钱的选择。



作者 Cynthia Potter,
Eppendorf UK,
Cambridge



作者 Arun Kumar, Ph.D.,
Eppendorf North America,
Westbury, N.Y.