

Opentrons PCR 工作站 自动化PCR制备反应方案



摘要

随着生命科学届对PCR的需求正在增加。在本应用说明中，我们展示了 Opentrons PCR 工作站与市面主流的外置第三方热循环仪相比，能够生成预期的PCR扩增产物的碱基对长度。结果显示，无论是嵌套 PCR 还是多重 PCR，都能产生预期的 PCR 扩增产物的碱基对长度。

简介

由于样品制备过程中可能存在污染、技术错误和时间限制，复杂方案（例如巢式 PCR 和多重 PCR）的效率和准确性难以保障。多重 PCR 实验用于 GMO（转基因生物）检测、法医学、食品分析、突变和多态性检测、基因缺失分析、模板定量、连锁分析以及更多应用。这些多重反应非常高效，可在孔槽中产生两个或多个扩增子的产物。

巢式 PCR 是另一种高度特异性的技术，可用作有用的诊断工具，用于识别生物样品中的病原体，例如动脉粥样硬化斑块中的牙周病原体、转移性乳腺癌细胞以及结核分枝杆菌和马尔尼菲青霉等病毒病原体与仅需要一个扩增步骤的标准 PCR 不同，巢式 PCR 具有两步扩增过程。第一个 PCR 扩增步骤中生成的 PCR 扩增子用作第二个扩增步骤的模板。这些复合 PCR 实验可能会因最终产品的不同而变得繁琐和耗时。Opentrons PCR 工作站可以自动化实现 PCR 实验，只需要进行非常少量的手动准备工作，就可以产出稳定的一致性结果。

材料和方法

多重 PCR 实验步骤

使用从铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌分离的基因组 DNA 进行了多重 PCR 实验。根据先前的研究，设计了针对铜绿假单胞菌（*lasI*、*lasR*、*gyrB*）和金黄色葡萄球菌（16S rRNA、*clfA*、*mecA*、Eubacterial 16S rRNA）多个位点区域特异性的正向和反向引物。每个孔预期产物的大小分别为 600、700 和 222 bp。在 Opentrons OT-2 的平台上，在 0.1 ml 96 孔全裙边 NEST 板上准备了 20 μ L 的多重 PCR 反应混合物，并使用设备上的热循环仪进行扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。同时，为了对比分析，我们也手动准备了相同的实验，并在第三方手动热循环仪上运行。

巢式 PCR 实验步骤

巢式 PCR 是用于鉴定从 lambda 噬菌体分离的生物样品中的病原体的方法。根据先前的研究，针对铜绿假单胞菌（*lasI*、*lasR*、*gyrB*）和金黄色葡萄球菌（16S rRNA、*clfA*、*mecA*、Eubacterial 16S rRNA）设计了特异性的多个位点区域的正向和反向引物。PCR 组分被提供给 OT-2 平台，并转移到 0.1 ml 96 孔 NEST 板中。在混合和 Opentrons 热循环模块自动密封之前，最后加入 DNA 模板。对于第二个扩增步骤，使用 0.1 ml 的 NEST 孔板重复此过程，并将其密封后放置在第三方热循环仪上。第一次扩增的扩增产物被用作阳性对照。

PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析。所有实验都使用Qubit BR定量，并计算变异系数以评估扩增的一致性。

实验结果

使用Opentrons 热循环模块在OT-2上进行自动化多重PCR实验，运行结果显与第三方热循环仪相当。

多重 PCR 的实验布局采用了 Kim 等人在 2018 年的研究中的方法。样品孔位标记为绿色，阴性对照标记为蓝色（见图1）。

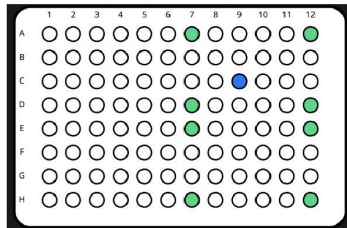


图1：用于自动化多重PCR实验的孔位。

绿色孔位表示样品，蓝色孔位表示阴性对照。

为了评估自动化多重 PCR 的高灵敏度和特异性，在凝胶上进行PCR产物检测。与第三方热循环仪生成的PCR产物相比（图 2B），OT-2热循环仪上生成的 PCR 扩增产物不仅显示出更清晰和明显的条带，而且长度符合预期（*lasI*为600bp，*lasR*为700bp，*gyrB*为222bp）（图 2A）。

为了进一步证明 OT-2 的效率，使用针对金黄色葡萄球菌（16s rRNA、*clfA*、*mecA*、Eubacterial 16s rRNA）的特异性引物进行了自动化多重 PCR。预期的碱基对长度分别为 791bp、638bp、499bp 和 371bp，并在琼脂糖凝胶上检测（图 2C）。同时，使用相同的 PCR 组分进行了手动多重 PCR 协议，使用第三方热循环仪进行操作（图2）。在 OT-2 上自动化和手动进行的多重 PCR 都显示出了类似的扩增效果（图 2A、2B）。

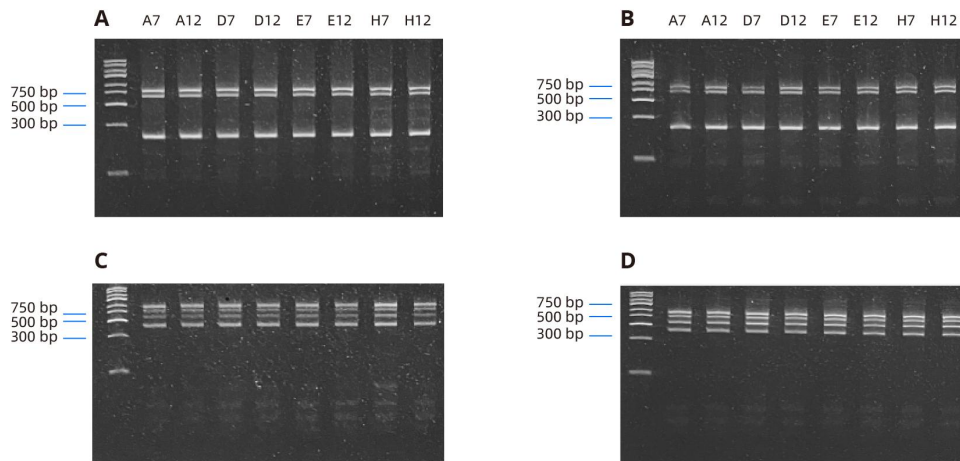


图2：在OT-2和第三方热循环仪上分别进行铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌目标基因的多重 PCR

在每个孔位上测试的铜绿假单胞菌基因组DNA中扩增了预期长度为600、700和222 bp的*lasI*、*lasR*和*gyrB*目标。

A) 1-8道显示了在OT-2上自动加样和热循环后的产物。

B) 1-8道显示了在第三方热循环仪上手动加样后的产物。在每个孔位上测试的金黄色葡萄球菌基因组DNA中扩增了预期长度为791、638、499和371 bp的16s rRNA、*clfA*、*mecA*和真菌的16S rRNA目标。

C) 1-8道显示了在OT-2上自动加样和热循环后的产物。

D) 1-8道显示了在第三方热循环仪上手动加样后的产物。

为了验证在OT-2和第三方热循环仪上生成的 PCR 的精确性，分析了变异系数（CV%），结果显示在多重 PCR 和 巢式 PCR 实验中，OT-2 的 CV% 值与第三方热循环仪相比相同或较低，表明扩增的均匀性更好（见表1）。

表1：在不同模板类型和PCR实验中表现出高度均匀的扩增效果。

CV值（变异系数）为经过Qubit定量后计算得出的结果，分别显示了在OT-2和第三方热循环仪上进行的每个实验的CV值。

| PCR 类型 | 样本 | 热循环设备 | CV (%) |
|--------|----------------|-------|--------|
| 多重 PCR | 金黄色葡萄球菌 | OT-2 | 8.4 |
| 多重 PCR | 金黄色葡萄球菌 | 第三方设备 | 13.4 |
| 多重 PCR | 铜绿假单胞菌 | OT-2 | 2.8 |
| 多重 PCR | 铜绿假单胞菌 | 第三方设备 | 9.1 |
| 巢式 PCR | Lambda (Outer) | OT-2 | 7.3 |
| 巢式 PCR | Lambda (Outer) | 第三方设备 | 9.1 |
| 巢式 PCR | Lambda (Inner) | OT-2 | 9.9 |
| 巢式 PCR | Lambda (Inner) | 第三方设备 | 8.8 |

在 OT-2 上进行巢式 PCR 自动化实验产生的 PCR 扩增产物与第三方热循环仪的产物相似。

在巢式 PCR 的布局中，样品孔以绿色标记，阴性对照孔以蓝色标记（图3）

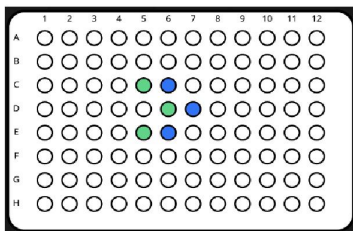


图3：巢式 PCR 实验中测试的孔。绿色孔表示样品，蓝色孔表示阴性对照。

设计了两组引物，用于检测 Lambda 模板 DNA 的 500 bp 和 247 bp 区域。第一次 PCR 运行中检测到了 500 bp 区域，而第二次 PCR 运行中检测到了 247 bp 区域。样品进行了三次巢式 PCR 重复实验，然后在 PCR 运行结束后对扩增产物进行分析。

在琼脂糖凝胶上分析了在 OT-2 和第三方热循环仪上生成的 PCR 扩增产物（图4）。外层扩增片段的预期大小为 500 bp，内层扩增片段为 247 bp。PCR 扩增产物显示出类似的产量和变异系数（CV%）（表1），实验结果说明了 OT-2 的产出与手工操作和第三方设备一致。

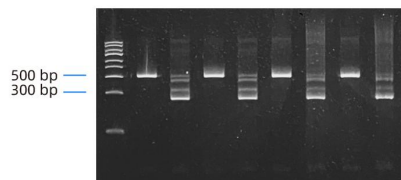


图4：Opentrons 热循环模块能够可精准地进行巢式PCR。外层扩增片段为 500 bp，内层扩增片段为 247 bp。1-4 道显示了在 OT-2 的 C5、D6和 E5 孔中产生的扩增产物，5-8 道是来自第三方热循环仪的 C5、D6 和 E5 孔的扩增产物。

结论

Opentrons PCR 工作站与第三方手动热循环仪对比, 在 PCR 扩增产物的碱基长度方面表现出精确的扩增能力, 并且移液精准度高。此外, Opentrons PCR 工作站展示了在一个孔中准确进行多重 PCR 以及巢式 PCR 实验的扩增能力。

REFERENCES

1. <https://www.bio-rad.com/featured/en/multiplex-pcr.html>
2. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2020.1742523>
3. <https://academic.oup.com/mmy/article/47/5/549/1050859>
4. <https://academic.oup.com/ajcp/article/142/3/384/1761402>
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4049700/>
6. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034115000465>
7. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-012-0760-2>