

Automatisiertes Pipettieren von Reaktionsansätzen für die Durchführung von PCR in 8er-Stripes und von RT-qPCR im 384-Well Format

Author: Dr. Marlen Alisch,
Experim. Clinical Research Center,
Neuroimmunologie Labor, Berlin

Einleitung

Die PCR und auch die quantitative Real Time PCR (RT-qPCR) gehören zu den Standardtechniken in der Molekularbiologie. Bei beiden Methoden werden spezifische Abschnitte der DNA oder transkribierte RNA vervielfältigt und analysiert. Bei der Standard PCR erfolgt der qualitative Analyse der Amplifikate mit Hilfe der Gelelektrophorese. Bei der RT-qPCR wird in Echtzeit die Menge an vervielfältigter DNA durch den Einsatz von interkalierenden Farbstoffen detektiert. PCR und RT-qPCR finden vielfältige Anwendung in der Molekularbiologie, wie zum Beispiel bei der Genotypisierung von transgenen Mäusen und der Genexpressionsanalyse von Zellkulturen.

Material und Methode

Genotypisierung

Für die Genotypisierung wird zunächst Gewebe (Ohr oder Schwanzbiopsie) der transgenen Mäuse lysiert und die DNA durch Isopropanolfällung isoliert. Der Nachweis von Transgenen oder Knockouts erfolgt durch die Durchführung einer PCR und anschließendem Gelelektrophoreselauf. Das Pipettieren des PCR Reaktionsansatz, bestehend aus Mastermix, Primer, Wasser und Probe erfolgt mit Hilfe der BRAND Liquid Handling Station (LHS).

Verwendung der Liquid Handling Station für das Pipettieren von PCR Ansätzen für die Genotypisierung

Mit Hilfe der Liquid Handling Station wird der komplette Reaktionsansatz einer PCR für 44 Proben und einer Non Template Control (NTC) pipettiert. Zunächst wird die entsprechende Menge Mastermix pipettiert. Nach dem Mischen wird das Volumen für eine Probenmenge in 8er PCR Stripes gegeben und im Anschluss die Probe in den Reaktionsansatz pipettiert.

Tabelle 1: Pipettierprogramm für einen PCR Ansatz für 44 Proben und 1 NTC.

Demand	Liquid End	Transfer
Transfer 3 x 192 µL Dreammix in Mastermix	200 µL	Rack1 Tube D3 → D6
Transfer 92 µL Primer in Mastermix	200 µL	Rack1 Tube D4 → D6
Transfer 23 µL H ₂ O in Mastermix	200 µL	Rack1 Tube D5 → D6
Mix Mastermix	200 µL	
Transfer 15 µL Mastermix in PCRmix	200 µL Multidispense	Rack 1 Tube D6 → 8-Stripes A1-A8, B1-B8, C1-C8, D1-D8, E1-E8, F1-F4
Transfer 10 µL Sample in PCR mix	50 µL	Rack 1 Tube A1-D2, Rack 2 Tube A1-D6 → 8-Stripes A1-A8, B1-B8, C1-C8, D1-D8, E1-E8, F1-F4

Genexpressionsanalysen mit RT-qPCR im 384-Well Format

Für die quantitative Real Time PCR erfolgt zunächst die Isolation und Aufreinigung von RNA aus Zellkulturen. Die RNA wird folgend in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung der qPCR erfolgt in Triplikaten in 384 Wells.

Verwendung der Liquid Handling Station fürs Pipettieren der RT-qPCR Ansätze im 384-Well Format

Die Ansätze für 8 verschiedene PCR-Reaktionen, bestehend aus den Komponenten SybrGreen Master Mix, Rox, UNG, Primer und Wasser werden entsprechend der Probenmengen in ein Tube vorgelegt. Mit Hilfe der Liquid Handling Station werden die Mastermixe in eine 96-Well Platte überführt und je 4 Proben und eine NTC dazu pipettiert. Im Anschluss wird mit dem 8 Kanal Liquid End aus der 96-Well Platte Triplikate in eine 384-Well Platte pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierprogramm für 8 RT-qPCR Ansätze für 4 Proben und 1 NTC.

Demand	Liquid End	Transfer
Transfer je 56 µL Mastermix in 96 well plate	200 µL	Rack1 Tube A1 → Rack 96-Well A1-5, B1-5, C1-5, D1-5, E1-5, F1-5, G1-5, H1-5
Transfer je 14 µL Sample in 96-well plate	50 µL	Rack1 Tube A5, B5, C5, D5, A6 → Rack 96 Well A1-5, B1-5, C1-5, D1-5, E1-5, F1-5, G1-5, H1-5
Transfer 3x 20 µL qPCR Mix in 384-well plate	50µL 8 Kanal	Beispiel für eine Probe 8 Reaktionsansätze: Rack 96-Well A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 → Rack 384 –Well A1-3, C1-3, E1-3, G1-3, I1-3, K1-3, M1-3, O1-3

Ergebnisse

Die Liquid Handling Station ermöglicht das automatisierte und zuverlässige Pipettieren von PCR Ansätzen für bis zu 44 Proben für die Genotypisierung. Bei großen Probenmengen stellt dies einen klaren Vorteil gegenüber dem Handpipettieren dar, da die Liquid Handling Station bei korrekter Programmierung dauerhaft fehlerfrei arbeitet. Die Anzahl der Proben können durch weitere Adapter erhöht werden.

Für das Pipettieren von RT-qPCR Reaktionen im im 384-Well Format ist die Liquid Handling Station unverzichtbar. Die Pipettiergenauigkeit ist vergleichbar mit einer Handpipettierung. Dies wird in Abbildung 1 deutlich, sie zeigt die Amplifizierung verschiedener Gene von Triplikaten. Pipettierfehler, die beim händischen Pipettieren von im 384-Well Format durchaus erfolgen können, sind durch die Verwendung der Liquid Handling Station ausgeschlossen.

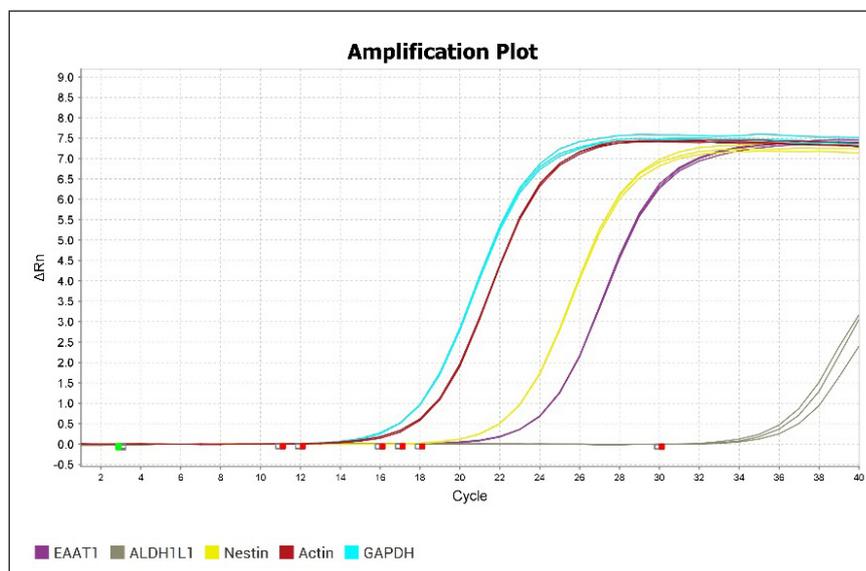


Abbildung 1: Amplification Plots von Triplikaten einer RT-qPCR