

对微孔板内培养的细胞进行通量化 RT-qPCR 检测

王玮琪, 韩帅, 陈铭

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (Real-time Quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 是通过内参或外参对样品中特定 DNA 分子进行相对定量分析的方法, 常用于基因表达分析、基因突变检测及病原体检测等方面。在样本制备过程中, 往往需要首先抽提 RNA, 反转录制备成 cDNA 文库。但对于大样本量及每个样本细胞数量较少的实验, 例如培养在 96 孔板或 384 孔板内的细胞样品, 很难利用传统方法抽提 RNA。本案例介绍了一种无需提取 RNA、在孔板内直接使用细胞裂解液进行快速反转录及 qPCR 的实验方法, 并利用自动化移液工作站及高通量精密加样仪器实现了通量化操作。该方法适用于 96/384 孔板中的各种动物贴壁细胞。对微孔板内培养的细胞进行通量化 RT-qPCR 检测的实验体系能够为科研实验中常面临的多样本多基因筛查有效节省实验时间, 同时也提高了实验稳定性。

关键词: 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应; RT-qPCR; 自动化; 通量化

High-throughput RT-qPCR Assay for Cells Cultured in Multi-well Plates

Wang Weiqi, Han Shuai, Chen Ming

(Center for Excellence in Molecular Cell Science, CAS, Shanghai 200031, China)

Abstract: Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) is a method used for relative quantification of specific DNA molecules in a sample, using internal or external references. It is commonly used for gene expression analysis, gene mutation detection, and pathogen detection. During sample preparation, it is often necessary to extract RNA first and prepare cDNA libraries by reverse transcription. However, for experiments with large sample sizes and low cell numbers per sample, such as cell samples cultured in 96-well or 384-well plates, it is difficult to extract RNA using traditional methods. This case introduces a method for rapid reverse transcription and qPCR using cell lysate directly in multi-well plates without RNA extraction. High-throughput operation is realized by using an automated liquid handling

workstation and a liquid dispenser. The method is suitable for various animal adherent cells cultured in 96/384 well plates. The high-throughput cell-direct RT-qPCR assay system can both effectively save operation time and also improve data stability for multi-gene detection experiments.

Keywords: qPCR; Automation; High-throughput

1 材料和方法

1.1 试剂

Hieff® Fast Cell Direct SYBR Green RT-qPCR Kit (翌圣生物, 货号 11172ES60)

1.2 细胞

A549

1.3 仪器

非接触式微量自动分液仪 (Mantis, Formulatrix)

自动移液工作站 (Bravo, Agilent)

实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio6 FLEXA, Applied Biosystems)

水平离心机 (5810R, Eppendorf)

自动分液器 (Multidrop Combi, Thermo)

1.4 实验操作

(1) 使用 Multidrop Combi 将 A549 细胞铺至 96 孔板 (384 孔板) 并进行特定处理, 72 h 后细胞总数约为 50000 个左右 (384 孔板中约为 96 孔板细胞数的 1/3);

(2) 手动甩去孔内大部分培养基, 倒扣放入水平离心机, 200 rpm, 30 s, 弃净孔内中所有残留培养液;

(3) 使用 Mantis 在孔板中加入试剂盒中的 washing buffer, 96 孔板每孔加入 150 μ l (384 孔板每孔加入 70 μ l), 手动甩去大部分液体后, 200 rpm 倒扣离心 30 s 弃净孔内残留液体;

(4) 使用 Mantis 在 96 孔样品板内加入 48 μ l FCD Lysis buffer (384 孔板 24 μ l) 及 2 μ l DNase I 组分 (384 孔板 1 μ l), 室温静置 10 分钟使细胞裂解; 随后使用 Mantis 加入 2.5 μ l stop solution (384 孔板 1.5 μ l), 1000 rpm 离心 30 秒使溶液混匀;

注: FCD Lysis buffer 和 DNase I 溶液混匀后一起加入;

Mantis 芯片设置要适配所添加液体体积。

(5) 使用 Mantis 在一块新的 PCR 板中按下列比例加好除细胞样品外的其他反转录体系所用试剂；使用 Bravo 将特定体积的裂解液(根据预实验确定)转移至 PCR 板，混匀后进行反转录，每孔总体积 20 μ l；

- ① 5 μ l 4x Hieff FCD RT Mix
- ② X μ l 裂解产物
- ③ 15-X μ l RNase-free H₂O

反转录条件：55℃ 15min，85℃ 5min；

注意：裂解产物添加量不超过总体积的 45%，即 9 μ l。

(6) 取一块新的 PCR 板，使用 Bravo 将 cDNA 产物用 Nuclease-free H₂O 进行稀释（稀释 10-1000 倍，根据不同基因表达水平而定）；

(7) 使用 Mantis 在 qPCR 板内加入除反转录产物以外的反应体系，而后使用 Bravo 将第（6）步所得 cDNA 稀释液转移至 qPCR 板内混匀，每孔试剂及用量如下：

- ① 5 μ l 2x Hieff FCD qPCR SYBR Master Mix
- ② 0.2 μ l Forward Primer(10 μ M), 0.2 μ l Revers Primer(10 μ M)
- ③ X μ l 反转录产物
- ④ 4.6-X μ l RNase-free H₂O

上机进行 qPCR 检测前短暂离心。

(8) 上机进行 qPCR，扩增程序参数见表 1。

表 1 qPCR 快速扩增程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	30 sec	1
变性	95 °C	10 sec	40
退火/延伸	60 °C	30 sec	
熔解曲线阶段	默认设置		1

上述体系参照了 Hieff® Fast Cell Direct SYBR Green RT-qPCR Kit 的说明^[1]。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 数据

表 2 及 表 3 展示的是在某次涉及多样本、多基因的基因敲减后表达水平检测实验中利用自动化仪器完成上述实验流程所得到的 qPCR 检测结果,其中 表 2 的数据是同批次实验中多个不同处理方法下的两个复孔所得相对应目的基因的 ΔCt 值及两复孔间的 CV(%);表 3 的数据是两批次独立实验中同种处理的样本各目的基因的 ΔCt 值及两批次实验间的 CV(%)。可以从中看出批次内及批次间样本复孔数据重复性和稳定性都较好, CV%稳定在 10%以内。

表 2 同次实验中不同样本 qPCR 结果

检测基因 序号	内参基因 Ct 值		目的基因 Ct 值		ΔCt 值		样本重复	
	样本重复	样本重复	样本重复	样本重复	样本重复	样本重复	SD	的 ΔCt 值
	1	2	1	2	1	2		CV(%)
基因 1	20.382	20.012	32.212	30.938	11.831	10.927	0.639	5.618
基因 2	20.406	19.818	31.939	30.445	11.533	10.628	0.640	5.779
基因 3	21.039	19.881	29.338	28.526	8.300	8.645	0.244	2.884
基因 4	20.613	19.311	29.305	29.015	8.692	9.704	0.716	7.780
基因 5	20.369	19.368	33.272	32.541	12.904	13.174	0.191	1.464
基因 6	18.997	20.864	33.133	33.148	14.137	12.285	1.310	9.913
基因 7	19.127	19.642	34.011	33.925	14.885	14.284	0.425	2.914
基因 8	20.373	20.512	31.592	33.563	11.220	13.051	1.295	10.672
基因 9	19.643	19.929	30.179	28.965	10.536	9.037	1.060	10.831
基因 10	20.838	22.839	30.692	34.175	9.854	11.336	1.048	9.894
基因 11	20.392	19.735	30.338	28.163	9.946	8.428	1.073	11.684

表 3 不同次实验中同样本 qPCR 结果

检测基因 序号	重复实验 1			重复实验 2			重复实验
	qPCR 复孔 1	qPCR 复孔 2		qPCR 复孔	qPCR 复孔 2		的 ΔCt 值
			ΔCt 值			ΔCt 值	
	Ct 值	Ct 值		1 Ct 值	Ct 值		CV(%)
内参基因	18.164	18.578	/	19.637	19.301	/	/
基因 1	26.340	25.812	7.705	28.263	28.566	8.946	10.536
基因 2	25.944	26.050	7.626	26.786	26.866	7.357	2.537

基因 3	25.865	26.023	7.573	27.168	27.031	7.630	0.534
基因 4	25.413	24.836	6.753	25.911	25.767	6.370	4.130
基因 5	25.885	25.798	7.470	25.996	26.198	6.628	8.449
基因 6	26.501	26.806	8.282	26.720	26.745	7.264	9.264
基因 7	25.747	25.754	7.379	26.258	25.944	6.632	7.542
基因 8	26.901	27.405	8.782	27.925	27.946	8.467	2.586
基因 9	26.372	26.753	8.192	26.978	26.693	7.367	7.499
基因 10	26.789	26.734	8.390	27.273	27.394	7.864	4.576
基因 11	30.268	30.297	11.911	30.877	29.809	10.874	6.438

2.2 讨论

对于大样本量及每个样本细胞数量较少的实验样品进行 qPCR 时，很难利用传统方法抽提 RNA；而且手动进行大量样本多个基因的 RT-qPCR 上机样本制备通常会花费较多时间，加样容易出错，多批次实验间加样误差较大。本案例建立了无需提取 RNA、在孔板内直接使用细胞裂解液进行快速反转录及 qPCR 的实验方法，并利用自动化移液工作站及高通量精密加样仪器实现了通量化操作，可以很好解决上述问题，很大程度上提高了实验效率及数据可信度。

参考文献：

[1]Hieff® Fast Cell Direct SYBR Green RT-qPCR Kit 说明书 . <http://www.yeasen.com/products/detail/3044>