

使用 OT-2 自动化移液平台进行高效核酸提取



作者

Jethary Rader and Kinnari Watson, Ph.D.

应用概述

随着不断进步的技术推动，现代分子生物学持续取得万众瞩目的突破和发展，包括更大规模的研究、更强大的治疗方法以及全新的研究问题。然而，尽管核酸提取这项技术是分子生物学得以进步的一项重要且密不可分的实验环节，科研人员仍然在沿用着几十年前冗长而繁琐的程序进行核酸提取。在这样的困局之下，自动化解决方案应运而生。现代自动化通过引入具备稳定性和高效运作优势的机器设备完成标准化流程高效自动运行，自动化核酸提取将使生物实验室旧有的工作方式迎来现代化。为了真正意义上帮助科研人员达到高效研发或生产的目的，自动化系统需要达到甚至超越高技能技术人员的表现，为下游工作流程提供高质量的样本。

本项研究旨在测试Opentrons OT-2核酸工作站作为有效自动化磁珠基因提取工具的性能。研究中使用了几种研究人员和临床医生常用的常见模板：人类唾液、人类口腔拭子、细菌培养物和RNA病毒。同时，使用了行业中常见的主流试剂品牌。通过产量、CV值和qPCR数据进行性能评估，实验数据将与高技能技术人员的手动操作结果进行比较。

经过研究测试，OT-2表现优异。使用OT-2进行提取的实验变异性降低，同时复现率提高，并且能在较低的成本和更快的周转时间下提供了类似的产量。重要的是，这些性能改进和成本节省可以随着吞吐量的增加而提升。因此，该测试表明，使用 OT-2 进行核酸提取自动化可以使实验流程高效自动化，让自动化核酸提取能够满足高端分子生物学的高性能标准。

研究材料和方法

人类唾液：从匿名捐赠者处收集新鲜唾液并储存在 15 mL 锥形管中直至使用。

口腔拭子：使用 20 mm break point (Zymo@) 口腔采集拭子对匿名志愿者进行采样，并储存于在 1 mL Zymo DNA/RNA 保护液中，室温保存运输。

细菌培养：使用 One shot® TOP10 制备感受态大肠杆菌 (Thermo Fisher Scientific®) 在 37°C, 225 rpm 振荡条件下在溶菌液中培养过夜。使用前，每个样品用 2000 rpm 离心 1.5 分钟。去除上清液，沉淀物被重新悬浮于等体积的冷磷酸盐缓冲液中。此外，对于乳酸杆菌样品，每个样品使用约 1×10^7 拷贝/ μL 的 *Lactobacillus plantarum* (ATCC®8014MINIPACK™)。

病毒：由于 2020 年 3 月 COVID-19 全球大流行开始 (1)，病毒 RNA 试剂盒中使用的合成 SARS-COV-2 RNA Control 2 (Twist Biosciences)，每个样品 10 拷贝/ μL 。

内部对照：按照 Panpradist、Nuttada 等人 (2) 中所述使用和创建合成鼻样基质 (SNM)。SNM 的配方为：110 mM NaCl、1% w/v 来自猪胃类型II的粘蛋白 (Sigma M2378-100G) 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w/v 人类基因组 DNA (Coriell NA12878)，混合体积为 TE/SNM 的 90%。每个病毒样本使用 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 的 SNM。

试剂盒：本项研究中选择了来自不同品牌的 DNA、RNA 和病毒 RNA 提取试剂盒 (参见表1)。总共检验了 7 个试剂品牌的 13 种试剂盒。

试剂	品牌	核酸类型	标记
Mag-Bind® Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit	Omega Bio-tek®	DNA	A
MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit	Promega®	DNA	B
MagneSil® Total RNA mini-Isolation System	Promega	RNA	C
Mag-Bind Total RNA 96 Kit	Omega Bio-tek	RNA	D
Quick-DNA/RNA™ MagBead	Zymo Research	RNA	E
Direct-zol-96 MagBead RNA	Zymo Research	RNA	F
NucleoMag® Virus Viral DNA/RNA Isolation	Macherey-Nagel®	病毒RNA	G
Maxwell® HT Viral TNA Kit	Promega	病毒RNA	H
RNAdvance viral XP	Beckman Coulter®	病毒RNA	I
Quick-DNA/RNA Viral MagBead	Zymo Research	病毒RNA	J
MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kit	MGI®	病毒RNA	K
Mag-Bind® Viral DNA/RNA 96 Kit	Omega Biotek	病毒RNA	L
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	Thermo Fisher®	病毒RNA	M

表1: 本研究所检验的提取试剂。

在七个知名试剂品牌中, 有两种DNA提取试剂盒、四种RNA提取试剂盒和七种病毒RNA提取试剂盒, 均可在OT-2上进行自动化操作。

提取: 在自动化检测之前, 我们对每个 DNA 和 RNA 提取试剂及模板进行了手动测试, 以获取手动测试基线浓度。每个模板在每种试剂中进行 7 次重复测试, 并配备 1 个阴性对照样本。本次研究在 Opentrons 平台上进行了自动化核酸提取。对于 DNA 和 RNA 提取试剂, 每个样本进行了 7 次提取。对于病毒RNA提取试剂盒, 包括了 22 个带有相同的 SARS-CoV-2 和 SNM 模板的样本。每个 OT-2 运行中都包括 1 个阴性对照样本 (nuclease-free H2O)。OT-2 的设备装配了 GEN2 磁珠纯化模块、p300 多通道移液器和可选配的 GEN2 温控模块, 对于 RNA 实验来说, 为保证更好的实验效果, 建议配备温控模块。根据不同的试剂盒, 需要使用大概 14 盒 300 µL 吸头, 1 个 NEST 的单孔储液器, 1 个 NEST 2 mL 深孔板, 2 个 NEST 12 孔储液槽和 1 个 PCR 孔板。

引物: 疾病控制与预防中心 (CDC) 的引物和探针:

- 2019-nCoV_N1-F (GACCCCAAATCAGCGAAAT)
- 2019-nCoV_N1-R (TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG)
- 2019-nCoV_N1-P (FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1)
- 2019-nCoV_N2-F (TTACAAACATTGGCCGCAAA)
- 2019-nCoV_N2-R (GCGCGACATTCCGAAGAA)
- 2019-nCoV_N2-P (FAMACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1)
- RP-F (AGATTTGGACCTGCGAGCG), RP-R (GAGCGGCTGTCTCCACAAGT)
- RP-P (FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1)

CDC引物和探针订购自从Integrated DNA Technologies公司, 又名IDT (2019-nCoV CDC EUA试剂盒)。N1、N2和RNase P以CDC推荐的浓度进行预混。

16s 引物:

- Forward (CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG)
- Reverse (CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCG)

16s 引物从 IDT 订购, 于 IDTE 1X TE 溶液 pH: 8.0 (DT) 中重悬, 稀释至 10µM 的工作浓度。

定量测量: DNA 和 RNA 样本的浓度可以使用 Qubit 4.0 Fluorometer™ (Thermo Fisher) 进行定量测量。

此外, 所有样品均在 PCR max ECO48 实时 PCR 系统上进行 qPCR 定量。RNA 样品使用 Luna® 通用探针一步式 RT-qPCR 试剂盒 (NEB) 进行测试, 浓度由 Lista、Maria Jose 等人测试 (3)。进行以下程序: 在 55°C 下进行逆转录 10 分钟。初始变性在 95°C 下进行 1 分钟, 然后进行 50 个循环, 即在 95°C 下变性 10 秒, 并在 60°C 下退火 30 秒。使用 Luna Universal qPCR Master Mix (NEB) 以制造商推荐的浓度对 DNA 样品进行测试。使用以下程序: 初始变性在 95°C 下进行 60 秒, 随后变性和延伸分别在 95°C 和 60°C 下进行 15 秒和 30 秒, 持续 40 个循环。

实验结果

通过 qPCR 和荧光计分析测量，OT-2 提取的核酸数量接近，核酸样品的一致性更高。

使用九种常用的提取试剂盒处理人类唾液和植物乳杆菌细菌培养物，并使用两种常见的 qPCR 靶标进行 qPCR 分析：RNase P 用于唾液样本，16s 用于细菌样本。使用六个试剂盒处理大肠杆菌培养物并使用荧光分析进行分析。

产量通过 qPCR 中的循环阈值 (Ct) 和荧光计中所得的 ng/μL 进行评估。一致性则通过 Ct 值的变异系数 (CV) 进行评估。

Ct 值反映了样品跨过高于背景信号的阈值所需的复制周期量，因此它们传达了数量的倒数测量。对于这些目标，在此类样品中，25-35 的 Ct 值较为可靠。

通过所有提取试剂盒进行检验测试，使用 OT-2 自动化系统进行核酸提取纯化可以得到具有较低 CV 和可比产量的 Ct 值 (见图 1 和表 2)。熟练的技术人员和 OT-2 返回的平均 Ct 值为 25-35。

手动处理的 CV 值为 1.41-4.8，OT-2 的 CV 值为 1.2-2.6。熟练的技术人员和 OT-2 提供了可比且一致的 24-26 ng/μL 的产量。这些结果表明，OT-2 能够在提高一致性和重复性的同时提供高产量。

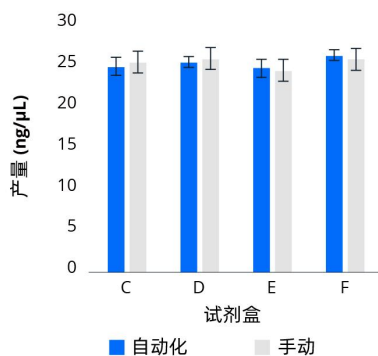


图1：显示自动提取的产量变异较小，并且提取纯化产量可媲美手动处理的结果。

OT-2 经过了符合 EUA 标准的 qPCR 性能测试，可以与多种核提取试剂盒一起使用。

在与新冠病毒相关的测试中，使用合成的 SARS-CoV-2 样本和七种常用的提取试剂盒进行了 qPCR。我们使用了 SNM 中的人类基因组 DNA 作为内部对照，使用 CDC 的 SARS-CoV-2 N1 和 N2 引物进行定量分析，同时使用 CDC 的 RP 引物作为阳性对照。

这项测试旨在评估使用不同提取试剂盒在 OT-2 上进行新冠病毒 qPCR 分析的性能。通过使用合成的 SARS-CoV-2 样本以及内部对照和阳性对照，可以判断 OT-2 在检测病毒基因组的准确性和可靠性。

对 qPCR 性能的评估是基于 PCR 检测紧急使用授权 (EUA) 标准。为了满足 EUA 标准，一个测试必须达到 95% 的扩增效果，也就是说，在 qPCR 中，95% 的样本必须产生可检测的 N1 和 N2 信号。

在这种性能评估中，我们还对 qPCR Ct 值进行了评估。对于这些目标，在这类样本中，标准 Ct 值应该在 30-40 之间。

根据表格 3 的结果，OT-2 几乎在所有试剂盒上的表现均通过了 EUA 标准。除了两个由于裂解缓冲液过粘稠导致妨碍了提取过程的试剂盒只有 91% 的测试结果合格。并且，所有被测试的试剂中，样品结果均实现了 31-39 的标准 Ct 值。这些结果表明，OT-2 系统可以与各种品牌的试剂配套使用，并达到临床标准。

为了测试 OT-2 系统的吞吐量和速度，我们使用了 13 种热门试剂盒进行了 RNA 和 DNA 提取，并覆盖了不同长度。为了全面评估不同吞吐量下的速度，测试了每批 8、24、48 和 96 个样本的情况。以从原始样品到纯化核酸所需的时间来衡量实验结果。

在这些提取试剂方案中，OT-2 系统在各种试剂盒和长度下实现了快速提取的结果。在最短的协议中，处理 8 个样本只需要 25 分钟，在最长的协议中，处理 96 个样本不到 5 小时 (图 2)。对于 8 个样本的处理时长，OT-2 在 13 种试剂盒中平均处理时间为 52 分钟。而在 96 个样本的情况下，OT-2 在 13 种试剂盒中平均处理时间为 2 小时 45 分钟。这些结果表明，OT-2 系统可以将其高性能与高吞吐量相结合，显著改善提取工作流程。

试剂	样品	手动结果		自动化结果	
		Mean CV (%)	Mean (Ct)	Mean CV (%)	Mean (Ct)
A	Human saliva	4.8	25.6	2.2	25.8
B	Human saliva	3.2	28.4	1.5	28.9
E	Human saliva	4.3	27	2	26.8
A	<i>L. plantarum</i>	3.15	34.2	2.6	34.1
B	<i>L. plantarum</i>	2.8	34.8	1.4	34.9
C	<i>L. plantarum</i>	1.43	30.9	1.2	31.4
D	<i>L. plantarum</i>	4.1	29.7	2	28.2
E	<i>L. plantarum</i>	3.5	29.8	2.6	30.7
F	<i>L. plantarum</i>	2	29.1	1.6	29.5

表 2: 这个表格展示了使用手动和自动处理方法进行的不同提取试剂盒在收率和精确性方面的可比性。表格左侧显示了平均变异系数 (CV) 和循环阈值 (Ct)。

试剂	N1		N2		RP		总通过率 %
	平均 Ct 值	通过率 %	平均 Ct 值	通过率 %	平均 Ct 值	通过率 %	
G	36	100	38	91	33	100	97
H	33	100	37	95	36	100	98
I	35	95	39	100	36	95	96
J	34	100	36	100	34	100	100
K	34	100	33	100	31	100	100
L	35	100	37	91	33	100	96
M	35	100	38	95	35	95	96

表 3: 这个表格说明了使用 SARS-CoV-2 病毒测试的质控规范, 展示了 OT-2 自动化的广泛适用性。使用 7 个不同品牌的 7 种病毒试剂盒在 OT-2 上进行自动化处理后, 每种试剂盒 (n = 22) 中有超过 96% 的样本合格。

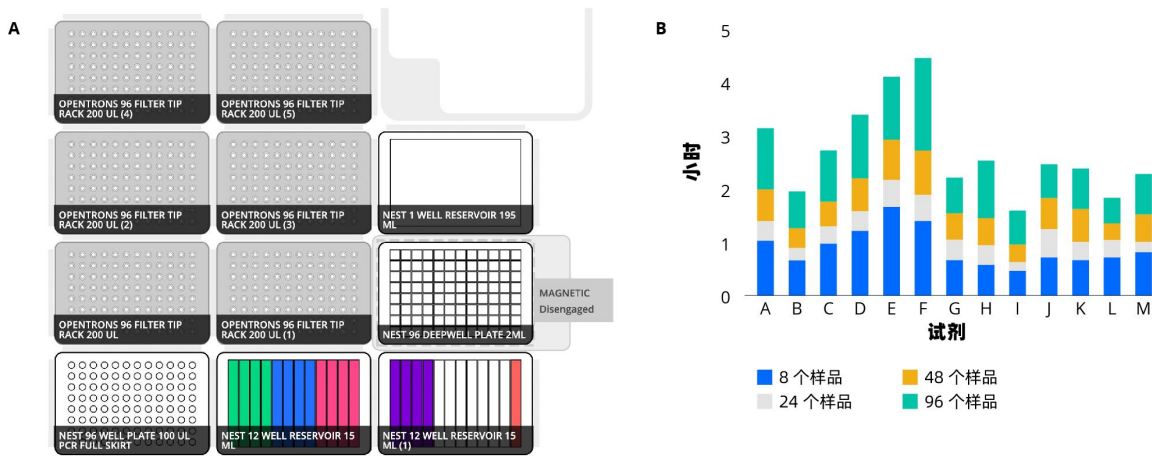


图 2: 展示了 OT-2 自动化移液工作站的甲板布局和运行时间, 适用于最多 96 个样品。
(A) 对应 96 个样品通量的 RNA 和 DNA 提取的 OT-2 甲板布局, 使用 Opentrons 提供的实验室耗材。
(B) RNA 和 DNA 提取协议中 8 个、24 个、48 个和 96 个样品的运行时间。

研究思考

OT-2 核酸提取工作站从有机和合成原始模板中提供了优质的 RNA 和 DNA 样品。通过 qPCR 和荧光测试发现，该自动化系统产生的产出与由高技术水平操作人员执行的手动结果相当，并且在实验复现率和精确性方面超过了手动操作的性能。研究表明，OT-2 成功地达到了满足紧急使用授权（EUA）标准级别性能的要求，qPCR 信号检测的成功率超过了 95%。时间测试显示，OT-2 处理 8 个样品的时间不到 1 小时，对于 96 个样品的处理时间不到 3 小时，这是针对具有不同协议长度的试剂盒的平均值。事实上，使用最快的试剂盒，OT-2 处理 8 个样品只需要 25 分钟，处理 96 个样品仅需 1 个半小时。

这些测试都是在具有临床和实验室意义的多个样品以及各种不同的提取试剂盒中进行的。OT-2 的灵活性使其能够适应各种协议、试剂和样本类型，以持续提供优质的结果。

应用总结

- 对于中等通量的实验室来说，光是节省的时间就足以让 OT-2 在不到 6 个月的时间内回本。
- OT-2 每次处理 24 个样品的提取可节省 3.5 小时的人工操作时间。与手动操作相比，更高的吞吐量带来更好的精确性、减少的变异性和提高的可重复性。
- 这种高性能可以促进更好的质量控制，减少下游数据的变异性。此外，消除了繁琐的人工操作程序可以减少错误，并降低因为使用昂贵试剂重复运行程序而产生的成本。

参考文献：

1. Cucinotta, Domenico, and Maurizio Vanelli. "WHO declares COVID-19 a pandemic." *Acta bio-medica: Atenei Parmensis* 91.1 (2020): 157-160.
2. Panpradist, Nuttada, *et al.* "Swab sample transfer for point-of-care diagnostics: characterization of swab types and manual agitation methods." *PLoS one* 9.9 (2014): e105786.
3. Lista, Maria Jose, *et al.* "Resilient SARS-CoV-2 diagnostics workflows including viral heat inactivation." *medRxiv* (2020).