



李彼得, 杨楚, 萨志, 尹和, 杨志. 卡尔弗, 凡妮莎·比格斯, 亚当·纳吉布, 彼得·尹, 和科妮莉亚·谢茨 (译录科学家)

## 《技术摘要》

大规模的基因组学实验、下一代测序和基因分型实验都经常使用qPCR作为诊断和定量基因序列的手段。这些实验要求在重现性和可靠性方面的鲁棒性。在这里，我们描述了自动协议的使用，一种用来描述方法的正式的开源语言，结合转录机器人工作单元作为一个平台来测试各种液体处理系统的qPCR的精度。我们证明了转录按需机器人云实验室在单个DNA浓度实验中快速可靠地执行QPCR协议，在更复杂的实验中以最小的时间超过QPCR协议。这些实验的结果对于提高协议的效率和准确性至关重要，如站点定向诱突变、CRISPR组件、高通量药物筛选和目前在转录工作组上进行的生长曲线分析。

## 科学实验的开放标准

自动协议是一种正式表达生物实验的开源语言。有关更多信息，请访问<http://autoprotocol.org>.

### A. 自动协议协议

```
def omni_q(protocol, params):
    params = make_testable_dict(params)
    dna_vol = params.dna_vol
    reaction_vol = params.reaction_vol
    sybr_vol = reaction_vol / params.sybr_conc
    primer_vol = params.primer_vol
    mastermix_vol = reaction_vol - dna_vol
    water_vol = mastermix_vol - sybr_vol - primer_vol*2
    qPCR_plate = protocol.ref("qPCR_plate", cont_type="96-qPCR", discard=True)
    dna_tube = params.dna_tube
    primers = params.primers

    mastermix = provision_to_tube(protocol,
                                  "mastermix",
                                  "micro-3.0",
                                  "ra170mh526ba",
                                  sybr_vol*(dna+1.5))

    protocol.provision("ra170mh526ba", mastermix, water_vol*(dna+1.5))

    for primer in primers:
        protocol.transfer(primer, mastermix, primer_vol*(dna+1.5))

    for i in range(3, 4):
        mix_volume = mastermix_vol*(dna+1.5)/4
        s_time = (s_time_per_mix+1.0)/4
        protocol.mix(mastermix, mix_volume, repetitions=5, speed="8/second" * 6
                    (mix_volume/seconds_per_mix))
        protocol.transfer(mastermix, qPCR_plate.wells_from(dna+1, 24),
                          unit(15, "microliter"), mix_tip=True,
                          dispense_target=dispense_target(depth="11_bottom",
                                                            distance="0.664micrometer"),
                          blowout_buffer=True, pre_buffer="18microliter")

    protocol.transfer(dna_tube, qPCR_plate.all_wells(), dna_vol,
                      blowout_buffer=True, pre_buffer="18microliter",
                      dispense_target=dispense_target(depth="11_bottom",
                                                            distance="0.664micrometer"),
                      mix_after=True, mix_vol=reaction_vol/2, flow_rate="
28microliter/second", repetitions=5)
    protocol.seal(qPCR_plate)
    protocol.spin(qPCR_plate, "700g", "1minute")
    protocol.thermocycle(qPCR_plate, {
```

### B. 自动协议协议

```
"refact": {
    "mastermix": {
        "name": "micro-3.0",
        "discard": True
    },
    "primer2": {
        "name": "micro-1.5",
        "discard": True
    },
    "where": "cold_20"
    },
    "transfer": {
        "from": "dna_tube",
        "dispense_target": {
            "depth": {
                "distance": "0.664micrometer",
                "method": "11_bottom"
            }
        },
        "volume": "2.5microliter",
        "tip": "qPCR_plate",
        "blowout_buffer": True,
        "mix_after": {
            "volume": "7.5microliter",
            "repetitions": 5,
            "speed": "28microliter/second"
        }
    },
    "seal": {
        "object": "qPCR_plate",
        "type": "qPCR_plate",
        "top": "seal"
    },
    "acceleration": "700g",
    "duration": "1minute",
    "object": "qPCR_plate",
    "tip": "qPCR_plate",
    "top": "spin"
    },
    "mastermix": "qPCR_plate",
    "object": "qPCR_plate",
    "volume": "18microliter",
    "groups": {
```

### C. 转录卡视图

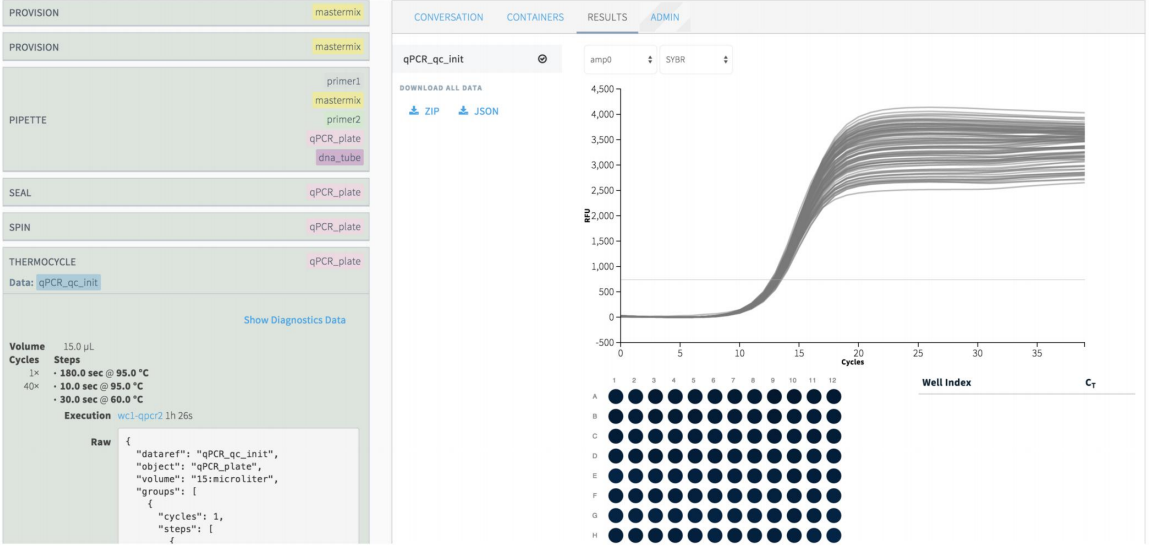


图1在三个不同的接口级别上查看的QPCR协议。开源的自动协议-Python库(A)可以用来有效地生成自动协议(B)，这是一款基于JSON的一系列指令，可以由转换工作单元来解释，以执行自动实验和呈现结果(C)。

## 转录性工作组

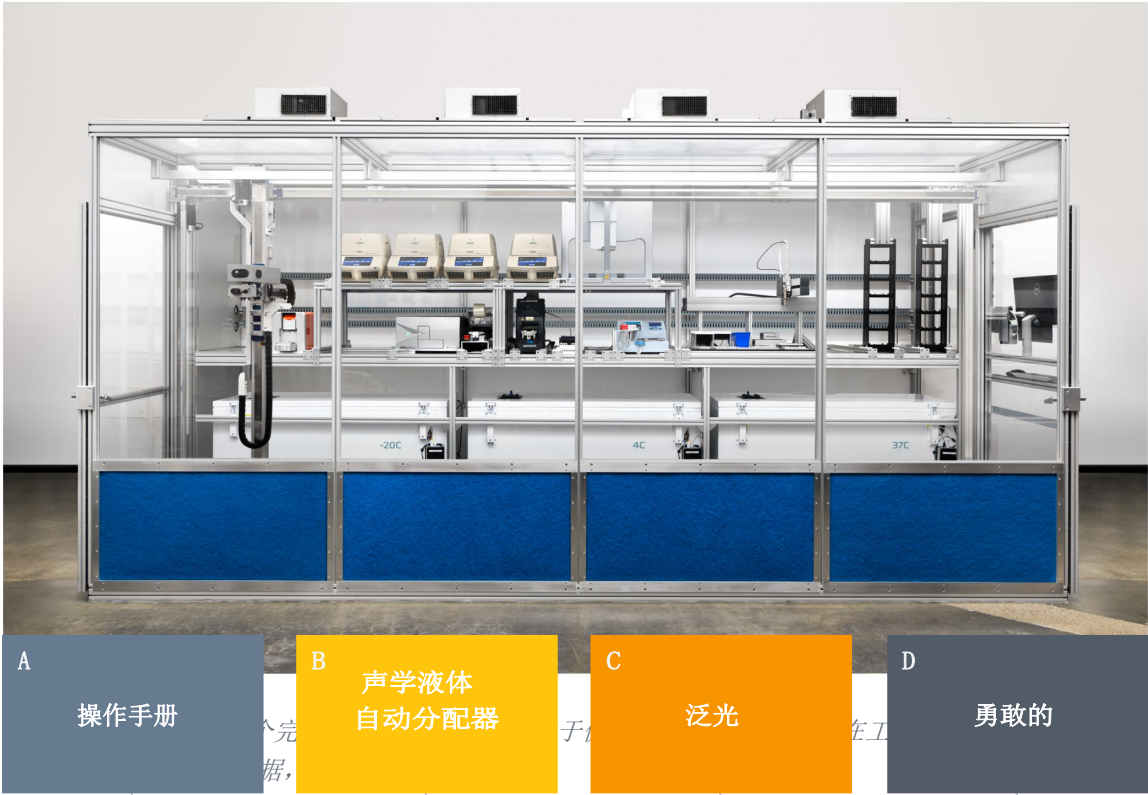
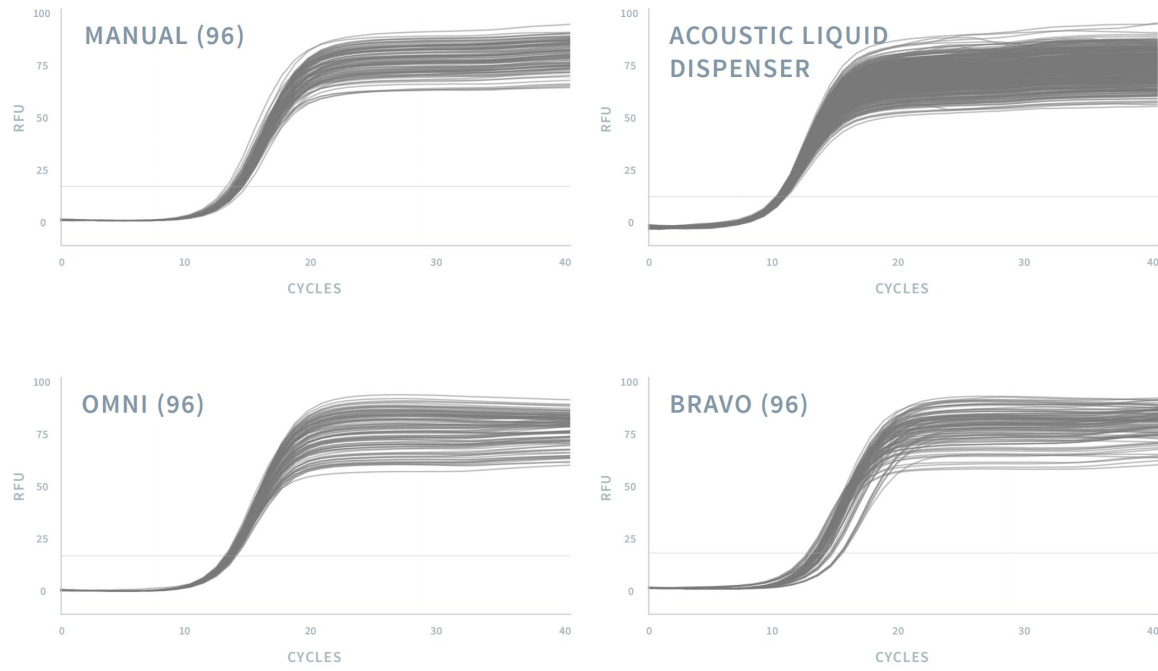


图34个液体处理装置使用的qPCR方法的差异 (由彩色框突出显示)。将训练有素的科学人员(A)进行的手动性能与声学液体分配器(B)、帝核桃OmniCavroADP单通道移液管(C)和安捷伦Bravo96LT多通道移液管系统(D)进行的自动液体处理进行比较。灰色方框列出了与所有设备相似的步骤。



EXECUTION METHOD	LIQUID HANDLING TIME	REACTION VOLUME	REAGENT REQUIREMENTS	MEAN STANDARD DEVIATION (n=3)
MANUAL	50 min	15 µL	1.5x	0.20
ACOUSTIC LIQUID DISPENSER	5 min	2.5 µL	1.1x	0.19
OMNI	70 min	15 µL	1.5x	0.23
BRAVO	45 min	15 µL	1.9x	0.45

### 复杂的指令减少了手动的再现性

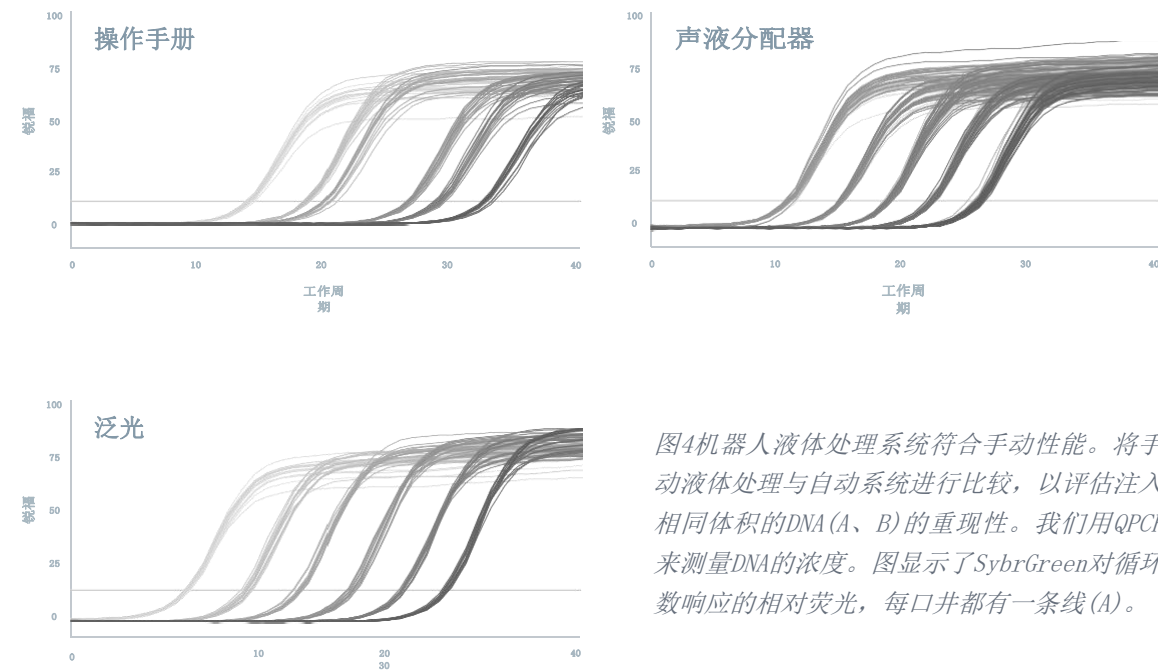


图4机器人液体处理系统符合手动性能。将手动液体处理与自动系统进行比较，以评估注入相同体积的DNA(A、B)的重现性。我们用QPCR来测量DNA的浓度。图显示了SybrGreen对循环数响应的相对荧光，每口井都有一条线(A)。

qPCR实验(B)的液体处理参数显示了在时间和试剂使用方面的差异。在连续稀释(C)进行QPCR时，自动液体处理具有可重复性。

## 研究结论

- 单通道液体处理与手动管道处理相匹配
- 声学液体处理匹配或比手动更好
- 声液处理可节省时间和试剂成本
- 当需要更复杂的任务时，单通道液体处理的性能要大于手动处理