

自动化移液工作站

- (1) 开机之前液体样品和试剂、枪头、96孔板的放置。一般 A1 放置枪头（带枪头盒），规格 50 μ l，一次可放 96 个。A2 位置放置试剂槽（Reservoir Rack，一次最多可放 7 个试剂槽）。B1 位置放置 Rack，Rack 上小孔，最多可直接放置 24 个 1.5ml 或 2ml 离心管（管中放置样品或试剂）；Rack 配置 12 个适配器，可放置 200 μ l 的 PCR 管（适合少量样品和试剂的转移）。B2 位置放置 96 孔 PCR 反应板（带 96 孔板适配器）
- (2) 连接仪器电源，打开仪器电源开关
- (3) 大约 5 分钟后，显示器直接显示仪器控制软件界面
- (4) 软件主界面介绍：File/Exit to Start Screen 打开控制软件所显示的起始界面；File/Show Keyboard 显示电子键盘，保存文件给文件命名时，输入数字或字母均需要打开电子键盘；File/Show Keyboard Automatically，选中该项，在需要输入字母或数字时自动显示电子键盘；File/Sound Enabled 关闭声音；File/Shutdown 关闭仪器控制软件，点击该项关闭过程结束时，显示器黑屏
- (5) Help/Device Manuals/epMotion5070 仪器硬件介绍及其使用。Help/Software Manuals 仪器软件介绍及其使用。Help/License Information 仪器生产许可证信息。Help/About epBlue 有关 epBlue 总体信息。Help/Open Source Licenses 打开源许可证协议
- (6) 点击“Application Runner”图标，查看已编辑程序的大概信息，出现“Application Runner”界面。(a) 点击“Eppendorf”图标，界面中间出现控制软件的名称。适合控制本机软件的名称为“Fill384_5070”和“Fill96_5070”两个。双击两个文件，出现“Available devices”和“Workable”信息。可显示仪器编号、使用移液枪的类型、操作面板排布等信息。(b) 点击“Home”图标，出现用户编辑和已使用过的程序信息。双击程序名称，可查看程序可控制硬件的大概信息
- (7) 点击软件起始的主界面“Application Editor”图标，出现“Application Editor”，选中“Home”图标，双击界面中间程序名称，可编辑或运行已存在的程

序。

- (8) 点击“New Application”图标，编写新的运行程序，出现“Create new application”界面，在 Name 框中填写程序名称，点击“OK”
- (9) 界面顶端中部出现“Home/程序名称-Applicational Editor”，即可开始编辑运行程序
- (10) 编辑工作界面“Worktable”。该仪器没有配置 Park1、Park2、Park3 区域，因此不用对其进行设置。T1/T2 为放置单通道和 8 通道移液枪，仪器自动进行识别。Waster 为废枪头收集区域。A1/A2/B1/B2 为需要编辑区域，主要设置 PCR 板、样品、试剂放置的位置
- (11) A1 位置通常放置枪头（带枪头盒）。设置方法：“Workable”界面下选中左侧“Tips”，在 Labware 界面选择“tips”类型。例如枪头的类型为 50 μ l 规格（不带过滤膜），选择 tip50: dws/tips/tip50，按下鼠标左键不放，直接拖到 A1 位置后松开鼠标，即可将 A1 设置为放 50 μ l 枪头位置，点击“OK”
- (12) A2 位置通常放置 Reservoir Racks with Modules，该模块上可放置 7 个 30ml 试剂槽，后续操作步骤同 A1
- (13) B1 位置放置 Rack with tubes（管中可放置样品或试剂）。设置方法：在界面左侧 Labware category 里面双击 Racks with Tubes，在 labware 里面出现各种规格的 Racks。本仪器配置的 Racks 为 Rack 0.5+Adaptor/1.5/2.0ml。在 Labware 里面用鼠标选中“Rack 0_5ml, dws/trth/Rack 0_5ml”不放，直接将该图标拖至 B1 位置后松开鼠标
- (14) B2 位置通常放置 96 孔反应板（位置 A2 的试剂盒 B1 样品分别转移至 96 孔反应板的各个小孔中）。设置方法：在界面左侧 Labware category 中双击 Thermoblocks with Plates，在 labware 界面出现各种规格的 Thermoblocks with Plates。本仪器直接选中“EP_Tube_Thermo_0_2ml dws/thermopl/EP_Tube_Thermo_0_2 ml”按下鼠标左键不放，直接拖至 B2 位置再松开鼠标，出现对话框点击“OK”即可
- (15) 在界面 Workable 下面用鼠标点击“Switch to procedure”，界面切换到“命令设置”界面。(a) Liquid Transfer 液体转移，有 6 种类型：①Number of Samples 样品数量；②Sample Transfer 样品转移；③Reagent Transfer 试剂

转移；④Dilutes 稀释；⑤Pool 试剂或样品混合；⑥Pool one destination 多种样品或试剂混合在一起。(b) Process 样品转移到目标孔后常见处理类型：①Mix 样品试剂转移到小孔后进行混匀；②Pierce 枪头顶端移至液面以下加样；③Wait 等待，可设置等待的时间

相对定量 PCR 反应系统建立-参考

相对定量的案例分析：测定叶片中 3 种基因 (G1、G2、G3) 在 7 种处理 (T1~T7) 条件下相对表达量的变化 (actin 为内参基因，每个样品 3 个重复)

(1) qPCR 反应体系 (总体积 20 μ l)：模板 DNA (样品) 1 μ l；Mix (内含 buffer 和荧光染料) 2 μ l；引物 1 2 μ l；引物 2 2 μ l；ddH₂O 13 μ l

(2) 96 孔板 (放置位置为 B2) 各孔加注样品：

孔编号	样品	孔编号	样品	孔编号	样品	孔编号	样品
A1~A3	actin-ck	A4~A6	G1-ck	A7~A9	G2-ck	A10~A12	G3-ck
B1~B3	actin-T1	B4~B6	G1-T1	B7~B9	G2-T1	B10~B12	G3-T1
C1~C3	actin-T2	C4~C6	G1-T2	C7~C9	G2-T2	C10~C12	G3-T2
D1~D3	actin-T3	D4~D6	G1-T3	D7~D9	G2-T3	D10~D12	G3-T3
E1~E3	actin-T4	E4~E6	G1-T4	E7~E9	G2-T4	E10~E12	G3-T4
F1~F3	actin-T5	F4~F6	G1-T5	F7~F9	G2-T5	F10~F12	G3-T5
G1~G3	actin-T6	G4~G6	G1-T6	G7~G9	G2-T6	G10~G12	G3-T6
H1~H3	actin-T7	H4~H6	G1-T7	H7~H9	G2-T7	H10~H12	G3-T7

(3) 枪头 (带枪头盒) 放置位置为 A1

(4) B1 位置放置 Rack with tubes (24 个小孔，可放置 24 个 1.5ml 或 2ml 离心管，配置适配器可放置 12 个 200 μ l 的 PCR 管)

(5) Rack with tubes 上小孔编号：A1~A6；B1~B6；C1~C6；D1~D6

(6) A1 为 Mix；A2 为 ck 样品，A3~A6 分别为 T1、T2、T3、T4；B1~B3 分别为 T5、T6、T7；B4~B5 分别为基因 actin 两个引物；B6 和 C1 分别为基因 G1 两个引物；C2~C3 分别为基因 G2 两个引物；C4~C5 分别为基因 G3 两个引物；C6 放置 ddH₂O

移液程序的设置:

- (1) 枪头（带枪头盒）放置 A1 位置，样品放置 B1 位置，96 孔板放置 B2 位置（具体设置步骤见前面）
- (2) 点击编辑程序主界面 Worktable/Switch to Procedure，切换到移液命令设置界面
- (3) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Number of Sample 图标，在 Procedure Start 中出现“1.Number of Samples”，在 Options 里面勾上 fixed number，在 Sample number 里面填写数字 1，点击界面上部“Save”按钮
- (4) **96 孔板中每个小孔加注 13 μ l ddH₂O**。双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Sample transfer 图标，在 Procedure Start 中出现“2.Sample transfer”，在 Options 里面编辑移液命令
- (5) Volume 里面填写 13，Pipet tool 里面选择 TS_50，Transfer type 里面选择 Multidisperse。在 Source 里面点击“+”号，选择 ResRack_1 6*4，点击 Add 后再点击“×”号，Source 里面出现该选项；在 Destination 里面点击“+”号，选择 Thermopl_1 12*8，点击 Add 后再点击“×”号，Destination 里面出现该选项
- (6) Source 和 Destination 设置好之后，点击“Pattern”，出现“Edit Pattern”界面，编辑移液模式
- (7) 在 Rack_2 种选中 C6，同时用鼠标将 Thermopl_1 中的所有孔选中（96 个孔），两个面板上孔的颜色一致。点击“OK”完成第 1 步移液设置，同时点击“Save”按钮，保存所编辑的程序
- (8) **96 孔板中每个小孔加注 2 μ l Mix**。双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Number of Sample 图标，在 Procedure Start 中出现“3.Number of Samples”，在 Options 里面勾上 fixed number，在 Sample number 里面填写数字 1，点击界面上部“Save”按钮
- (9) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Sample transfer 图标，在 Procedure Start 中出现“4.Sample transfer”，在 Options 里面编辑移液命令
- (10) Volume 里面填写 2，Pipet tool 里面选择 TS_50，Transfer type 里面选择

Multidisperse。在 Source 里面点击“+”号，选择 ResRack_1 6*4，点击 Add 后再点击“×”号，Source 里面出现该选项；在 Destination 里面点击“+”号，选择 Thermopl_1 12*8，点击 Add 后再点击“×”号，Destination 里面出现该选项

- (11) Source 和 Destination 设置好之后，点击“Pattern”，出现“Edit Pattern”界面，编辑移液模式
- (12) 在 Rack_2 种选中 A1，同时用鼠标将 Thermopl_1 中的所有孔选中（96 个孔），两个面板上孔的颜色一致。点击“OK”完成第 2 步移液设置，同时点击“Save”按钮，保存所编辑的程序
- (13) **样品添加**（样品有 ck、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7 共 8 个）。双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Number of Sample 图标，在 Procedure Start 中出现“5.Number of Samples”，在 Options 里面勾上 fixed number，在 Sample number 里面填写数字 8，点击界面上部“Save”按钮
- (14) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Sample transfer 图标，在 Procedure Start 中出现“6.Sample transfer”，在 Options 里面编辑移液命令
- (15) Volume 里面填写 1，Pipet tool 里面选择 TS_50，Transfer type 里面选择 Multidisperse。在 Source 里面点击“+”号，选择 ResRack_1 6*4，点击 Add 后再点击“×”号，Source 里面出现该选项；在 Destination 里面点击“+”号，选择 Thermopl_1 12*8，点击 Add 后再点击“×”号，Destination 里面出现该选项
- (16) Source 和 Destination 设置好之后，点击“Pattern”，出现“Edit Pattern”界面，编辑移液模式
- (17) 在 Rack_2 种选中 A2，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 A1~A12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 A3，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 B1~B12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 A4，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 C1~C12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 A5，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 D1~D12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 A6，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 E1~E12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 B1，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 F1~F12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 B2，同时用鼠

标将 Thermopl_1 面板中的 G1~G12 孔道选中；在 Rack_2 种选中 B3，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 H1~H12 孔道选中。Rack_2 和 Thermopl_1 两个面板对应的孔的颜色一致。点击“OK”完成第 3 步移液设置，同时点击“Save”按钮，保存所编辑的程序

- (18) **样品孔中两条引物的添加**（基因 actin、G1、G2、G3 正向和反向引物）。
双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Number of Sample 图标，在 Procedure Start 中出现“7.Number of Samples”，在 Options 里面勾上 fixed number，在 Sample number 里面填写数字 4，点击界面上部“Save”按钮
- (19) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Sample transfer 图标，在 Procedure Start 中出现“8.Sample transfer”，在 Options 里面编辑移液命令
- (20) Volume 里面填写 2，Pipet tool 里面选择 TS_50，Transfer type 里面选择 Multidisperse。在 Source 里面点击“+”号，选择 ResRack_1 6*4，点击 Add 后再点击“×”号，Source 里面出现该选项；在 Destination 里面点击“+”号，选择 Thermopl_1 12*8，点击 Add 后再点击“×”号，Destination 里面出现该选项
- (21) Source 和 Destination 设置好之后，点击“Pattern”，出现“Edit Pattern”界面，编辑移液模式
- (22) 在 Rack_2 种选中 B4，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)1~(A-H)3 孔道选中；在 Rack_2 种选中 B6，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)4~(A-H)6 孔道选中；在 Rack_2 种选中 C2，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)7~(A-H)9 孔道选中；在 Rack_2 种选中 C4，同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)10~(A-H)12 孔道选中。Rack_2 和 Thermopl_1 两个面板对应的孔的颜色一致。点击“OK”完成第 4 步移液设置，同时点击“Save”按钮，保存所编辑的程序
- (23) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Number of Sample 图标，在 Procedure Start 中出现“9.Number of Samples”，在 Options 里面勾上 fixed number，在 Sample number 里面填写数字 4，点击界面上部“Save”按钮
- (24) 双击 Commands/Liquid Transfer 中的 Sample transfer 图标，在 Procedure Start 中出现“10.Sample transfer”，在 Options 里面编辑移液命令

- (25) 在 Rack_2 种选中 B5, 同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)1~(A-H)3 孔道选中; 在 Rack_2 种选中 C1, 同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的 (A-H)4~(A-H)6 孔道选中; 在 Rack_2 种选中 C3, 同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)7~(A-H)9 孔道选中; 在 Rack_2 种选中 C5, 同时用鼠标将 Thermopl_1 面板中的(A-H)10~(A-H)12 孔道选中。Rack_2 和 Thermopl_1 两个面板对应的孔的颜色一致。点击“OK”完成第 5 步移液设置, 同时点击“Save”按钮, 保存所编辑的程序
- (26) 所有设置完成, 点击主界面上端的“√”号, 对所设置的程序进行检查, 无错误, 既可点击“Run”按钮, 运行程序