利用 JANUS 自动化液体工作站制备 96 孔板格式定制文库

Preparation of Customized Library in 96-well Plate by JANUS Automatic Liquid Workstation

杨卓, 韩帅, 陈铭*

化学生物学技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

*通讯作者邮箱: chenm@sibcb.ac.cn

引用格式: 杨卓, 韩帅, 陈铭. (2021). 利用 JANUS 自动化液体工作站制备 96 孔板格式定制文库. Bio-101 e1010826. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010826.

How to cite: Yang, Z., Han, S. and Chen, M. (2021). Preparation of Customized Library in 96-well Plate by JANUS Automatic Liquid Workstation. Bio-101 e1010826. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010826. (in Chinese)

摘要: 在大规模初筛结束后, 需要将阳性孔的试剂挑选出来组成一个新的亚库, 进行第二轮的复筛验证, 这个过程涉及定制文库的制备。另外, 当初筛的对象不是整个文库, 而是散在分布在整库中的一系列孔时, 也需要制备定制亚文库用于筛选。本文将以 ORF 过表达质粒亚文库的定制流程为例, 介绍如何从全基因组 ORF 过表达文库中挑选出感兴趣的质粒, 制备成各孔浓度一致、可直接用于整板细胞转染实验的质粒亚文库。此流程同样适用于化合物库、siRNA 文库及 sgRNA 文库等点阵式文库的亚文库定制, 具体移液参数可依据不同加样体积及液体性质略作改动。

关键词: 定制文库, 单挑, ORF

材料与试剂

1. 96 孔 U 底板 (Costar, catalog number: 3879)
2. 50 μ l 透明吸头 (Perkin Elmer, catalog number: 6001263)
3. 可撕铝膜 (安捷伦 PlateLoc, catalog number: 24210-001)
4. 全基因组 ORF 文库 (CCSB-Broad Lentiviral Expression Library, Horizon, -80 $^{\circ}$ C 保存)
5. OptiMEM (Gibco, catalog number: 31985070)

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, catalog number: centrifuge 5810R)
2. Multidrop 自动分液器 (Thermo, catalog number: Multidrop Combi)
3. Handler workstation 自动工作站系统* (Perkin Elmer, catalog number: HANDLER WORKSTATION SX 15)
 - a. UV 灯
 - b. HEPA
 - c. Janus 液体工作站 (8 通道独立吸头)
 - d. WinPREP®控制软件 (版本号: 4.10.0.54)

注: 仅列出系统在本实验中用到的部分仪器设备

4. 封膜机 (安捷伦 PlateLoc)

实验步骤

CCSB-Broad Lentiviral Expression Library 以菌液形式冻存在 96 孔板中, 包括~15,000 个克隆, 涵盖~11,000 个基因, 整个文库分布在 203 块 96 孔板中。我们对整个文库开展了基于 96 孔板的质粒抽提, 制备了人全基因组 ORF 质粒文库 (整板质粒抽提方法在本书其他相关章节介绍)。本实验的目的是在全基因组 ORF 质粒文库中挑取出感兴趣基因的质粒至 96 孔板中 (本文将以 43 个质粒的挑取为例), 同时使用 OptiMEM 将各孔质粒浓度调整一致, 制备成可直接分装并用于高通量细胞转染实验的质粒亚文库 (图 1)。

图 1. 实验流程图 OM, OptiMEM 母板; SP, ORF 质粒文库板; DP, 目的板。

一、准备工作：

1. ORF 质粒文库板 (source plate, SP) 准备：

从-80 °C 冰箱取出所需母板 (质粒存储板为 96 孔 U 底板)，室温下解冻后离心 (转速 $129 \times g$, 1 min)。

注：解冻时最好将每块板子摊开解冻，避免堆叠，否则易在封板膜上形成小液珠，离心不能完全去除。

2. OptiMEM 母板 (OM) 准备：

用 Multidrop 或排枪向 96 孔 U 底板相应数量的孔中加入 OptiMEM 200 μ l/孔 (本实验中涉及 43 种质粒单挑，因此在 A1-C6 孔内加入 OptiMEM，即图 2 中 OM 板红色孔位)。

注：OM 板的目的是溶液存储，方便液体工作站取液；也可用液体加样槽 (Perkin Elmer, catalog number: 5079598) 代替，死体积相对稍大，按照常规经验加入的液体量需要比实际用量多至少 50 ml，在单挑质粒数较多的实验中建议使用加样槽。

3. Handler workstation：紫外照射 20 min。

4. Handler workstation：HEPA 通风 10 min。

5. 将实验所需材料按照程序设置的位置摆放至液体工作站台面上。

二、液体工作站操作流程：

1. 向目的板 (destination plate, DP) 中加入指定体积的 OptiMEM，如表 1 第 6 列所示。

注：本实验最终获得各孔质粒稀释液的体积为 100 μ l；该体积可根据后续实验的具体需求进行相应调整，同时需考虑到移液体积不低于移液工作站的最小移液精确体积。

表 1. ORF 质粒定制文库加样表

Source plate	Well	plasmid (μl)	Destination plate	Well	OptiMEM (μl)
SP1	A8	2.6	DP	B2	97.4
SP2	B4	3.7	DP	C2	96.3
SP3	F5	14.4	DP	D2	85.6
SP4	E10	9.8	DP	E2	90.2
SP5	F5	15.3	DP	F2	84.7
SP6	G9	8.0	DP	G2	92
SP6	E10	15.7	DP	B3	84.3
SP7	A5	5.8	DP	C3	94.2
SP8	E3	12.5	DP	D3	87.5
SP9	F4	9.3	DP	E3	90.7
SP10	F1	6.8	DP	F3	93.2
SP11	A11	7.2	DP	G3	92.8
SP12	G8	2.6	DP	B4	97.4
SP1	E1	6.6	DP	C4	93.4
SP1	G11	4.2	DP	D4	95.8
SP2	E10	9.0	DP	E4	91
SP3	E6	5.3	DP	F4	94.7
SP4	E4	14.2	DP	G4	85.8
SP4	C7	11.5	DP	B5	88.5
SP5	G1	11.0	DP	C5	89
SP6	D2	16.0	DP	D5	84
SP7	E4	7.6	DP	E5	92.4
SP8	A2	7.1	DP	F5	92.9
SP8	F2	10.9	DP	G5	89.1
SP9	A3	8.2	DP	B6	91.8
SP10	F3	13.2	DP	C6	86.8
SP11	G4	4.0	DP	D6	96
SP12	A11	2.4	DP	E6	97.6
SP12	A5	5.3	DP	F6	94.7
SP1	E9	5.4	DP	G6	94.6
SP1	E11	1.7	DP	B7	98.3
SP2	H3	15.2	DP	C7	84.8
SP2	B4	6.5	DP	D7	93.5

SP2	F8	3.6	DP	E7	96.4
SP2	D6	8.6	DP	F7	91.4
SP3	B6	8.0	DP	G7	92
SP4	B1	6.8	DP	B8	93.2
SP5	E4	14.8	DP	C8	85.2
SP5	E2	7.8	DP	D8	92.2
SP5	F1	16.1	DP	E8	83.9
SP6	F9	7.7	DP	F8	92.3
SP7	B9	12.6	DP	G8	87.4
SP8	C11	3.2	DP	B9	96.8

Janus 工作台面布局及程序步骤 (如图 2 及视频 1 "OptiMEM 加样程序编辑.mp4"所示。因所用吸头量程为 1-50 μ l, 一次吸打不能完成, 所以分成 2 步):

- 从 OM 板的 A1-C6 孔 (图 2 红色孔位) 中各吸取 50 μ l 到 DP 对应孔位 (图 2 蓝色孔位), 吸取时吸头距板底 2 mm, 分液时吸头距板底 0.8 mm。
- 从 OM 板的 A1-C6 孔 (图 2 红色孔位) 中各吸取对应体积 (表 2 第 1 列) 到 DP 板对应孔位 (表 2 第 3 列), 吸取时吸头距板底 1.5 mm, 分液时吸头距板底 1 mm。

注: 若使用大量程吸头, 可一步完成移液。

视频 1. OptiMEM 加样程序编辑

图 2. 加入 OptiMEM 的 Janus 工作台面布局及程序步骤

表 2. OptiMEM 第二步加样表

OptiMEM-2 (μl)	Destination plate	Well
47.4	DP	B2
46.3	DP	C2
35.6	DP	D2
40.2	DP	E2
34.7	DP	F2
42	DP	G2
34.3	DP	B3
44.2	DP	C3
37.5	DP	D3
40.7	DP	E3
43.2	DP	F3
42.8	DP	G3
47.4	DP	B4
43.4	DP	C4
45.8	DP	D4
41	DP	E4
44.7	DP	F4
35.8	DP	G4
38.5	DP	B5

39	DP	C5
34	DP	D5
42.4	DP	E5
42.9	DP	F5
39.1	DP	G5
41.8	DP	B6
36.8	DP	C6
46	DP	D6
47.6	DP	E6
44.7	DP	F6
44.6	DP	G6
48.3	DP	B7
34.8	DP	C7
43.5	DP	D7
46.4	DP	E7
41.4	DP	F7
42	DP	G7
43.2	DP	B8
35.2	DP	C8
42.2	DP	D8
33.9	DP	E8
42.3	DP	F8
37.4	DP	G8
46.8	DP	B9

2. 向目的板 DP 中挑取所需的 ORF 质粒。

Janus 工作台面布局及程序步骤如图 3 及视频 2 "质粒单挑程序编辑.mp4"所示。每轮挑选台面上可摆放 12 块 SP，所以 32 块质粒母板需要 3 轮程序完成挑选；挑选按照表 1 第 1-5 列数据对应进行。吸取时吸头距板底 1 mm，分液时吸头距板底 2 mm。

视频 2. 质粒单挑程序编辑

图 3. ORF 质粒挑取的 Janus 工作台面布局及程序步骤

三、收尾工作：

1. 使用结束后的质粒文库板放置于封膜机上封膜 (封膜条件: 170 °C, 1.2 s), 或使用手封膜 (Costar, catalog number: 6570), 放回-80 °C 冰箱保存。
2. 制备好的质粒板可直接用于后续整板转染实验, 或封膜保存待用。
3. Janus 机械臂回归原位。

注意事项

1. 分液时采用 **Blowout** 模式，参数选择"low volume"，有助于将液体吹打干净 (图 4 红框)。
2. 吸头丢弃后，设定 200 μ l 水反冲洗注射器，保证再上下一轮吸头时，注射器下不会悬挂液滴 (图 5 红框)。

图 4. 分液模式及参数设定

图 5. 反冲洗注射器设定

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台全体成员的建议和帮助。

参考文献

1. Yang, X., et al. (2011). [A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs](#). *Nat Methods* 8(8): 659-661.