

Agilent SureSelect^{QXT} WGS 文库制备的质量控制

应用简报

作者

Eva Graf
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报按照 Agilent SureSelect^{QXT} WGS 文库制备方案，介绍了 Agilent 4200 TapeStation 系统在工作流程中的样品质量控制 (QC) 性能。基因组 DNA ScreenTape 分析法是对基因组 DNA 起始材料进行系列定量分析并提供完整性信息的可靠方法。安捷伦高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析法可在测序前对扩增的标签文库进行分子量测定和定量分析。数据还表明，采用 DNA ScreenTape 分析法所获得的结果与使用 Agilent 2100 生物分析仪系统和 Qubit 荧光计进行分析所得到的信息相一致。



Agilent Technologies

前言

Agilent SureSelect^{QXT} 全基因组文库制备试剂盒可生成用于 Illumina 配对末端多重测序的文库。SureSelect^{QXT} 文库制备对基因组 DNA (gDNA) 的起始量变化非常敏感。本方案建议使用 Qubit 仪器进行两次系列荧光分析来定量。采用基因组 DNA ScreenTape 分析法在 Agilent 4200 TapeStation 系统上运行相同样品，比较这两种方法所获得的结果。gDNA 起始量的偏差会导致所得片段分布不理想，使扩增文库中过大或过小的 DNA 片段所占比例过高。这种效应可以通过由各种 gDNA 起始材料（从低丰度到高丰度）产生的额外文库来说明。

扩增文库使用安捷伦高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析法及 4200

TapeStation 系统进行分析，将其结果与 SureSelect^{QXT} 方案推荐的高灵敏度 DNA 分析法及 Agilent 2100 生物分析仪系统分析所得结果进行比较。

扩增文库的分析结果显示，高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析与 2100 生物分析仪系统获得的分子量和摩尔浓度结果相一致。

材料与方法

4200 TapeStation 系统 (G2991AA)、2100 生物分析仪系统 (G2939AA)、SureCycler 8800 热循环仪 (G8800A)、用于 WGS 的 SureSelect^{QXT} 文库制备试剂盒 (G9682A)、高灵敏度 D5000 ScreenTape (5067-5592) 和试剂 (5067-5593)、基因组 DNA ScreenTape (5067-5365) 和试剂 (5067-5366)、高灵敏度 DNA 试剂盒 (5067-4626)，以及 OneSeq 参比 DNA 男性 (5190-8848) 购自安捷伦科技公司。NanoDrop 1000、Qubit 3.0 荧光计 (Q33216) 和 Qubit dsDNA BR 分析试剂盒 (Q32850) 购自赛默飞世尔科技公司。使用区域功能来实现 DNA 文库的定量测定。除非另有说明，否则所有分析均按照生产商的方案和指南进行。

结果与讨论

图 1 说明了使用 gDNA 作为起始材料生成全基因组测序 (WGS) 文库的 SureSelect^{QXT} 方案。简而言之，样品在一步酶解步骤中进行碎裂和接头标记，然后进行 PCR 扩增，在此期间对接头连接的片段进行扩增和标记。然后使用磁珠清洁扩增的接头连接的文库，并在测序前分析以确定合适的分子量、数量，并进行纯度（不含接头二聚体产物）评估。

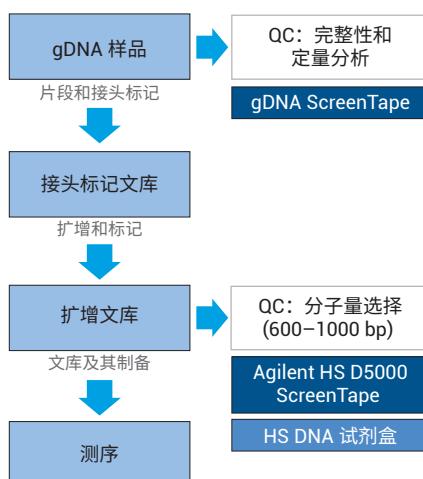
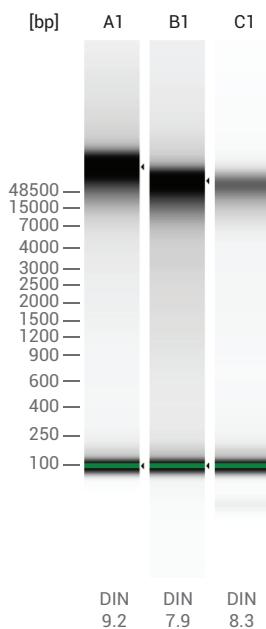


图 1. Agilent SureSelect^{QXT} WGS 文库制备工作流程及质量控制步骤

gDNA 的数量和完整性

SureSelect^{QXT} WGS 方案需要高质量的 DNA 样品，以获得最佳性能和 gDNA 起始材料的精确定量结果。按照该方案使用配有 dsDNA BR 分析试剂盒的 Qubit 仪器进行系列定量分析。将相同的样品在 4200 TapeStation 系统和 NanoDrop 中均进行 6 次重复基因组 DNA ScreenTape 分析。图 2 显示了获自 4200 TapeStation 系统、Qubit 和 NanoDrop 的数据，说明了基因组 DNA ScreenTape 分析法适用于对 gDNA 起始材料进行定量分析。采用 UV 光谱法测定 gDNA 所得的量常会过高，这是由于其他缓冲液成分在 UV 光谱中也可能有吸收⁴。

此外，基因组 DNA ScreenTape 分析法可在同一 QC 步骤中客观评价样品完整性。样品完整性由 TapeStation 分析软件的 DNA 完整值 (DIN) 计算功能自动测定（图 3）。



与其他系统不同的是，基因组 DNA ScreenTape 分析方法及 4200 TapeStation 系统只需 1 μ L 样品即可在一步分析中同时对质量和数量进行评价。

Agilent SureSelect^{QXT} 全基因组文库的片段分子量测定

除了 gDNA 起始材料的初始质量控制外，SureSelect^{QXT} 方案还建议对扩增文库进行质量控制，从而确保在测序前显示整个片段的分子量范围。片段

平均分子量显著小于 600 bp 可能表明碎裂反应中的 gDNA 过少，或者可能与测序数据的重复分析次数增加有关。相反，文库中片段平均分子量异常大（超过 1000 bp）可能表明碎裂反应中的 gDNA 过多，并且可能需要更高的 DNA 浓度以在测序反应中获得最佳的群集密度。

为了证明这一点，制备起始量为 20、50 和 80 ng 的文库，用 50 ng gDNA 样品生成的文库作为标准文库。图 4 显示了与 2100 生物分析仪系统相比，

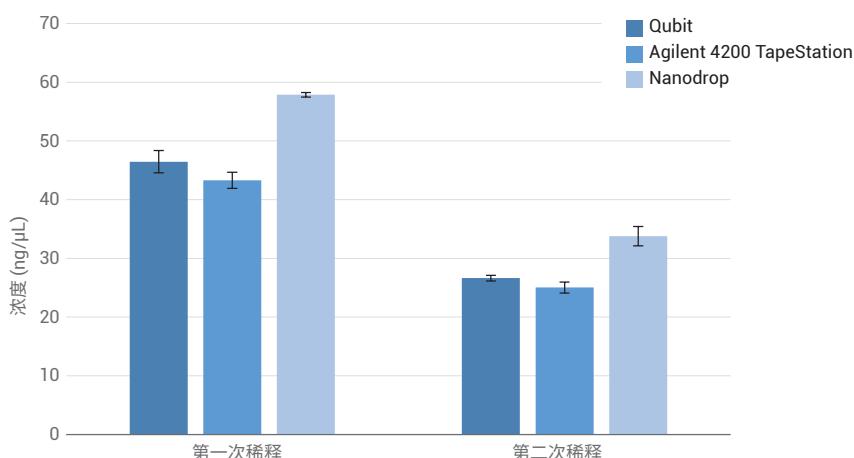


图 2. 安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法所得的定量分析数据与由 Qubit 和 NanoDrop 所得数据比较

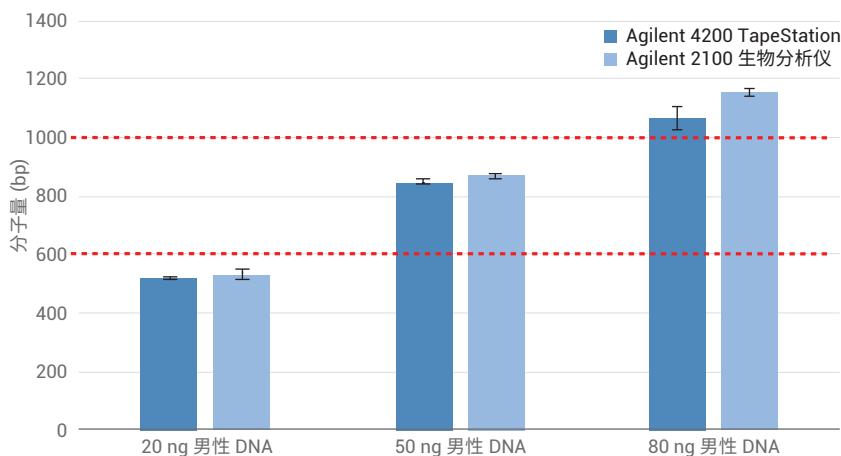


图 4. Agilent 4200 TapeStation 与 Agilent 2100 生物分析仪所得片段分子量比较。针对起始量分别为 20、50（推荐）和 80 ng gDNA 的文库，对其平均分子量进行了比较。虚线显示了可接受的扩增文库的平均分子量范围（600 bp 和 1000 bp）

4200 TapeStation 系统在评估分子量测定方面的性能，通过用上述起始量对文库进行三次重复区域分析来评估。图中的数据展现了两个系统所得的文库分子量有很好的相关性。

不同 gDNA 起始量的电泳叠加图显示，使用 2100 生物分析仪 (A) 和 4200 TapeStation (B) 系统，文库片段分子量分布（图 5）呈现出不同的弥散条带曲线。50 ng 的最佳 gDNA 起始量可得到平均分子量在 600–1000 bp 之间的文库曲线。最小的 gDNA 起始量产生的文库通常会导致其分子量范围趋向于更小。相反，gDNA 起始量过大导致大 DNA 片段比例过高，从而产生的文库的分子量范围趋向于更大。此外，所有电泳图均未显示接头二聚体产物，表明文库纯度很高。

SureSelect^{QXT} 全基因组文库的定量分析

对于多重测序，将 SureSelect^{QXT} 全基因组文库合并，使每个插入标记的样品在库中的摩尔量相同。文库的最佳起始浓度取决于测序平台。它可能还需要根据文库的 DNA 片段分子量范围进行优化，以获得所需的最终量和数据质量。4200 TapeStation 和 2100 生物分析仪系统可在区域表中提供摩尔浓度定量数据和分子量信息（图 6）。

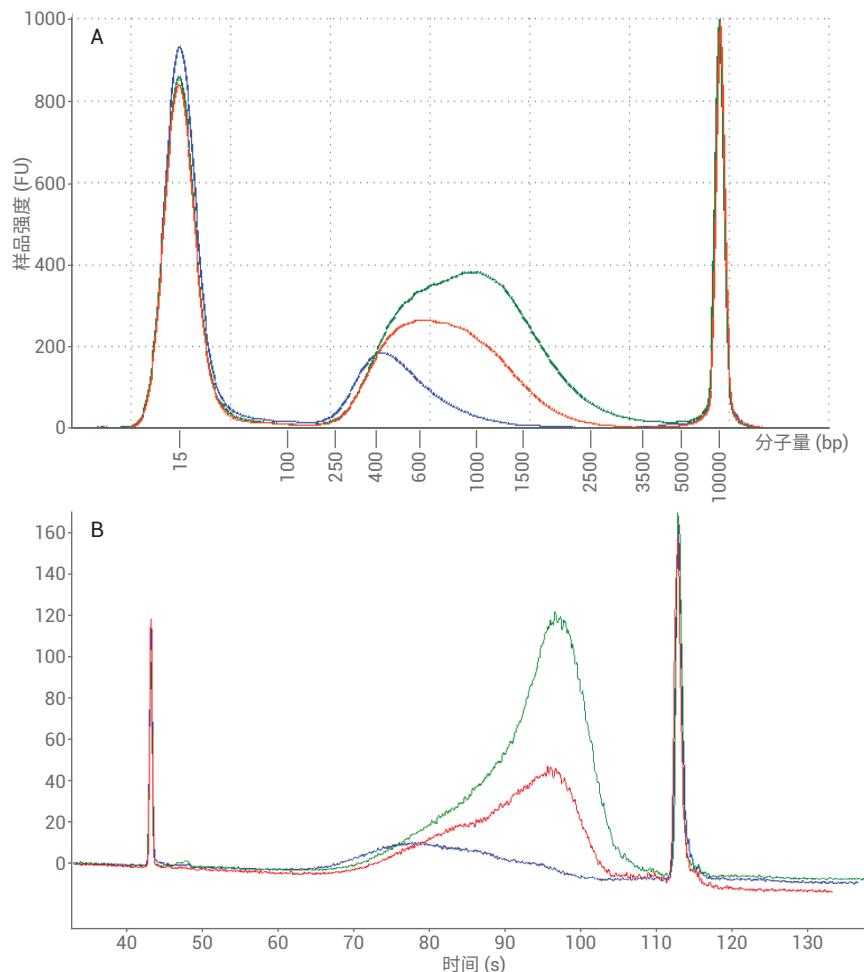


图 5. 使用 Agilent 4200 TapeStation (A) 和 Agilent 2100 生物分析仪系统 (B)，gDNA 起始量分别为 20 (蓝色)、50 (推荐, 红色) 和 80 ng (绿色) 所得文库的电泳叠加图

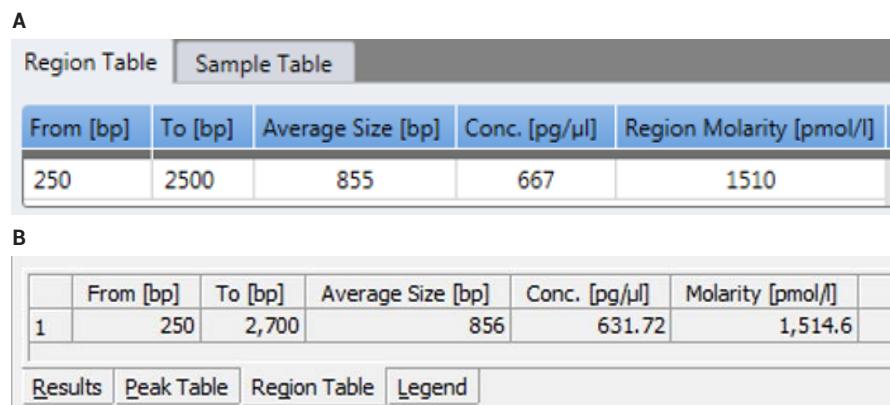


图 6. 显示扩增文库的平均分子量、浓度和摩尔浓度的区域表屏幕截图。A) 区域视图中的 Agilent TapeStation 分析软件。B) Agilent 2100 Expert 软件中的弥散条带分析结果

对于每个由不同 gDNA 起始量产生的文库，将其摩尔浓度绘制在两个系统的对比图中（图 7）。

表 1 中的汇总数据表明，使用高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析法得到的扩增文库的分子量和定量分析结果，与 SureSelect^{QXT} WGS 方案推荐的 2100 生物分析仪系统及高灵敏度 DNA 分析法得到的结果相一致。

结论

本应用简报证明了 Agilent 4200 TapeStation 是可用于 Agilent SureSelect^{QXT} WGS 文库制备过程中进行样品分析的可靠系统。

高质量 DNA 样品和 gDNA 起始材料高重现性的定量结果是成功制备 SureSelect^{QXT} 文库必不可少的条件。安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法可对基因组 DNA 起始材料实现精确定量分析，并在同一 QC 步骤中对样品完整性进行评估。

安捷伦高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析法是用于 SureSelect^{QXT} WGS 扩增文库的分子量测定和定量分析的理想工具。4200 TapeStation 系统除了具有与 SureSelect^{QXT} 方案推荐的 Agilent 2100 生物分析仪系统等效的性能外，还具有高度灵活的样品通量和易用性。

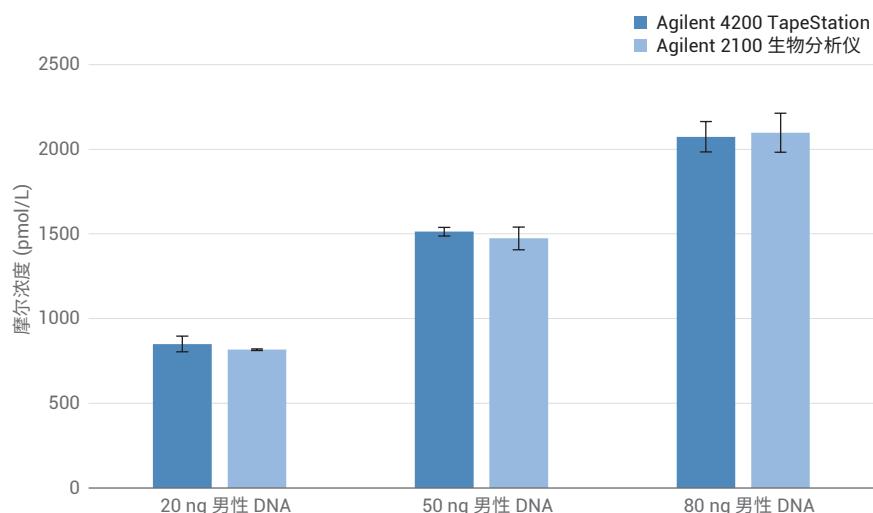


图 7. Agilent 4200 TapeStation 和 Agilent 2100 生物分析仪系统所得的扩增文库的定量分析结果比较

表 1. 使用 Agilent 4200 TapeStation 和 Agilent 2100 生物分析仪系统分析扩增文库所得的分子量和定量分析结果

起始材料	平均分子量 (bp)		区域摩尔浓度 (pmol/L)	
	Agilent 4200 TapeStation 系统	Agilent 2100 生物分析仪系统	Agilent 4200 TapeStation 系统	Agilent 2100 生物分析仪系统
20 ng	均值	519	850	817
	%CV	1.2	5.4	0.6
50 ng	均值	849	1513	1473
	%CV	0.6	1.7	4.5
80 ng	均值	1065	2073	2097
	%CV	3.8	4.3	5.5

参考文献

1. G9682-90000. SureSelectQXT Whole Genome Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing (用于 Illumina 多重测序的 SureSelectQXT 全基因组文库制备试剂盒) <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G9682-90000.pdf>
2. G2991-90150. Agilent High Sensitivity D5000 ScreenTape Assay Quick Guide for 4200 TapeStation System (用于 4200 TapeStation 系统的安捷伦高灵敏度 D5000 ScreenTape 分析快速指南)。http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/4200-TapeStation_HS-D5000_QG.pdf
3. G2991-90040. Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay Quick Guide for 4200 TapeStation System (用于 4200 TapeStation 系统的安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析快速指南)。http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/4200-TapeStation_gDNA_QG.pdf
4. O'Neill, M.; et al. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *J. Physics: Conference Series* **2011**, Volume 307, Issue 1. <http://www.iopscience.iop.org/1742-6596/307/1/012047>

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。

不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2017

2017 年 7 月 1 日, 中国出版

5991-8191ZHCN



Agilent Technologies