

Controle de qualidade de amostras em soluções de NGS Agilent

Autores

Madhurima Biswas e Shweta Sharma Agilent Technologies, Inc. La Jolla, CA EUA

Weiwei Liu, Tracy Liu e David Weiss Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA EUA

Resumo

O sequenciamento de Próxima Geração (NGS) é uma ferramenta valiosa e de alto rendimento para a rápida geração de dados de sequenciamento em grande escala. Esta tecnologia se vale da capacidade de sequenciar vários fragmentos curtos em paralelo, gerando assim grandes quantidades de leituras que podem ser compiladas em uma sequência de consenso, representando o genoma que está sendo sequenciado. A produção de dados de NGS de alta qualidade depende da qualidade da biblioteca de fragmentos curtos. A Agilent desenvolveu um conjunto completo de ferramentas para a geração de bibliotecas para NGS a partir de DNA e RNA, com ou sem o enriquecimento de regiões específicas no genoma ou transcriptoma. Avaliar com precisão a qualidade das amostras ao longo do fluxo de trabalho é essencial para o sucesso de modo geral. A Agilent oferece duas plataformas de eletroforese automatizadas, os sistemas TapeStation e Bioanalyzer, que podem ser facilmente integrados aos fluxos de trabalho de geração de bibliotecas para NGS.

Esta Nota de Aplicação fornece mais informações sobre a relevância do controle de qualidade de amostras (CQ) e fornece exemplos de perfis de eletroferogramas esperados e anômalos ao longo do processo de preparação e enriquecimento de bibliotecas em ambas as plataformas de eletroforese automatizadas.

Introdução

O portfólio de produtos de NGS da Agilent permite a criação eficaz de bibliotecas de DNA e cDNA de alta qualidade. Essas bibliotecas podem então ser submetidas a enriquecimento de alvo usando bibliotecas de oligonucleotídeos longos. Essa tecnologia de enriquecimento de alvo permite maior representação e sequenciamento focado das regiões de interesse. A Agilent oferece três soluções de enriquecimento de alvo estabelecidas, incluindo SureSelect^{XT}, SureSelect^{XT2}, baseado em um método de ligação de várias etapas, SureSelect^{QXT}, baseado em um método de tagmentação mediado pela transposase, e HaloPlex e HaloPlex^{HS}, baseado em um método de amplicon

à base de enzimas de restrição. O fluxo de trabalho SureSelect^{XT2} permite o agrupamento pré-captura de 8 ou 16 amostras, dependendo do tamanho da captura. O HaloPlex e o HaloPlex^{HS} se valem de fragmentação mediada por digestão de restrição e fluxo de trabalho rápido, bem como códigos de barras moleculares no caso do HaloPlex^{HS}, para detecção de variantes raras.

É fundamental quantificar e monitorar com precisão a qualidade da amostra à medida que ela progride através de vários fluxos de trabalho. Os fluxos de trabalho de enriquecimento de alvo do SureSelect e HaloPlex integram os sistemas TapeStation e Bioanalyzer para avaliação quantitativa e qualitativa de amostras em várias etapas-chave (Figura 1).

Materiais e métodos

Sistemas TapeStation 4200 (G2991AA) e TapeStation 2200 (G2965AA) com ScreenTape D1000 (5067-5582) e reagentes (5067-5583), ScreenTape D1000 de alta sensibilidade (HS D1000) (5067-5584) e reagentes (5067-5585), ScreenTape de DNA genômico (5067-5365) e reagentes (5067-5366), sistema Bioanalyzer 2100 (G2939BA) com kit DNA 1000 (5607-1504) e kit de DNA de alta sensibilidade (HS DNA) (5067-4626), SureSelect^{XT} (G9611A), SureSelect^{XT2} (G9621A), SureSelect^{QXT} (G9681A), HaloPlex (G9901C) e HaloPlex^{HS} (G9931C). Os kits de reagentes foram obtidos da Agilent Technologies. A determinação da quantidade de bibliotecas de DNA foi medida usando a funcionalidade de região. A menos que indicado, os protocolos e diretrizes do fabricante foram seguidos.

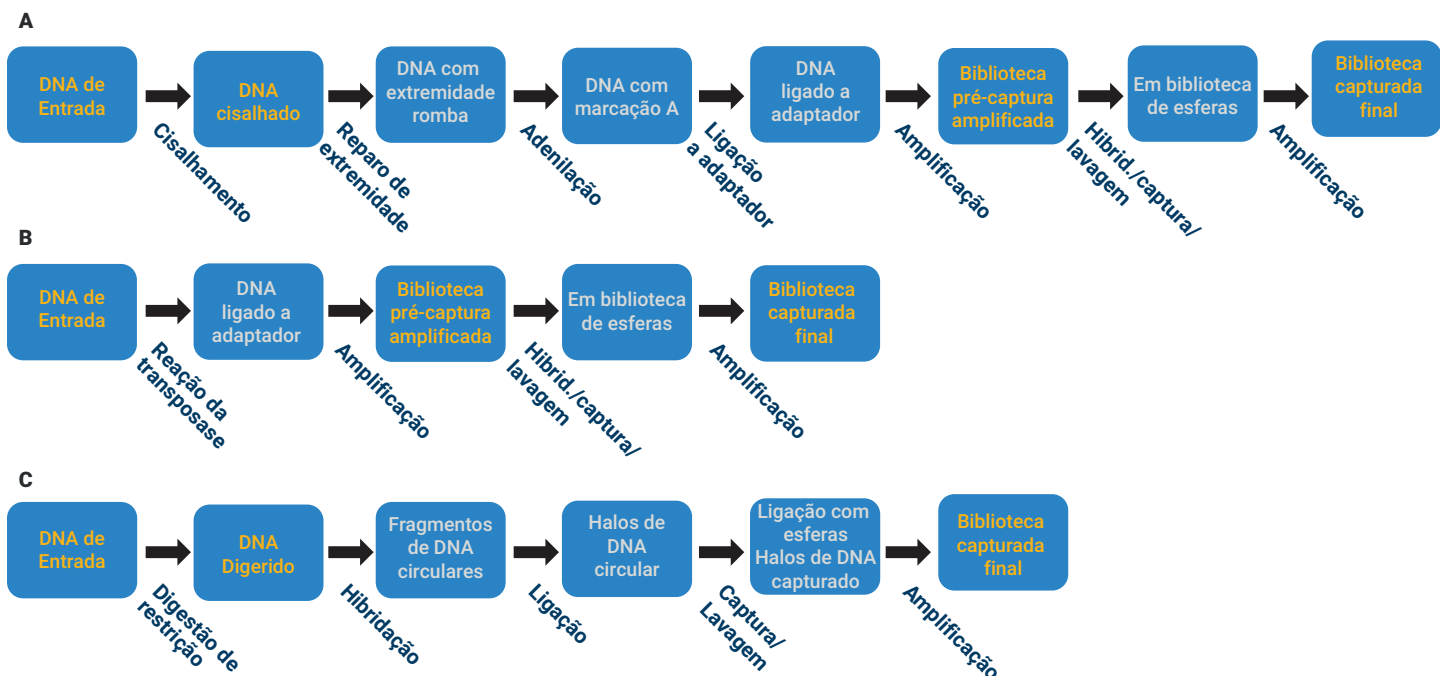


Figura 1. Visão geral do fluxo de trabalho esquemático dos sistemas de enriquecimento de alvo da Agilent com pontos de verificação de CQ recomendados destacados em amarelo usando os sistemas TapeStation ou Bioanalyzer. A) O fluxo de trabalho de preparo de bibliotecas SureSelect^{XT} e SureSelect^{XT2}; o CQ na etapa pós-cisalhamento é opcional. B) O fluxo de trabalho de preparo de biblioteca SureSelect^{QXT}. C) O fluxo de trabalho de preparo de biblioteca HaloPlex e HaloPlex^{HS}. A digestão enzimática é testada analisando a digestão do DNA de controle do enriquecimento (ECD), incluído no kit.

Resultados e discussão

SureSelect^{XT} e SureSelect^{XT2}

Os métodos de preparação de bibliotecas de ligação adaptativa multietapas, como o SureSelect^{XT} e o SureSelect^{XT2}, têm quatro pontos principais de CQ no fluxo de trabalho geral de preparo e captura de bibliotecas: entrada de DNA, pós-cisalhamento, biblioteca amplificada pré-captura e biblioteca amplificada pós-captura (Figura 1A)¹. Cada um desses pontos do CQ fornece informações críticas para a criação bem-sucedida de bibliotecas de sequenciamento.

A avaliação da qualidade do material de entrada tem um impacto significativo no processamento downstream. É importante determinar a integridade média dos fragmentos do material de partida, de modo que quaisquer modificações necessárias ao protocolo possam ser feitas para levar em consideração DNA excessivamente degradado. Dependendo do tipo de amostra, o comprimento pode ser avaliado no sistema TapeStation ou no Bioanalyzer. Por exemplo, se DNA genômico (gDNA) for o material de partida, a sua avaliação será melhor realizada no sistema TapeStation usando o ensaio ScreenTape de DNA genômico Agilent e o número de integridade do DNA (DIN)² gerado por software. O DIN permite avaliação numérica da integridade do gDNA, sendo 1 o mais degradado e 10 o mais intacto (Figura 2). Na maioria dos casos, um DIN maior que 7 é aceitável para a próxima etapa de preparo da biblioteca^{3,4}. Quando a degradação da amostra não pode ser evitada (por exemplo, se derivada de tecido embebido em parafina e fixado em formalina - FFPE), os valores mais baixos de DIN requerem mais DNA de entrada, maior número de ciclos de PCR e sequenciamento mais profundo.

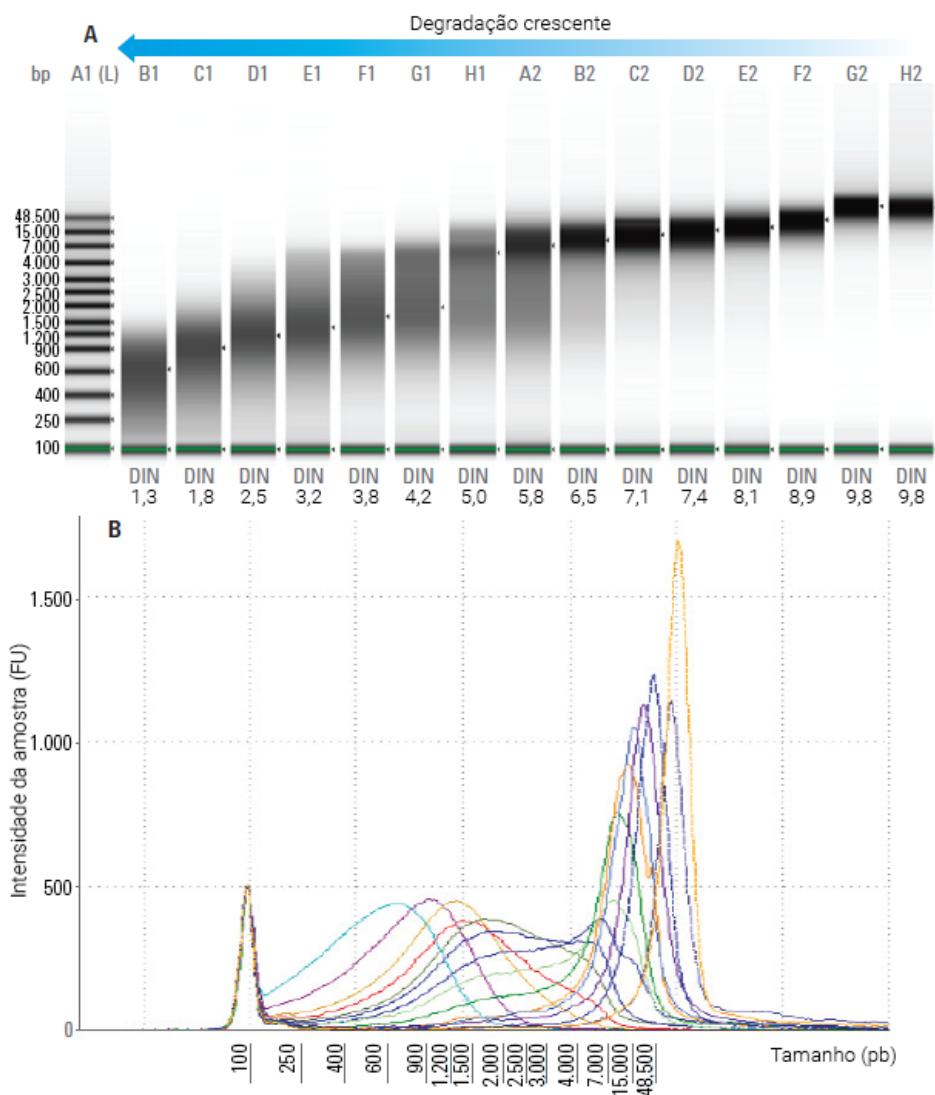


Figura 2. Avaliação da integridade do gDNA de uma série de amostras com degradação crescente usando o ensaio de DNA genômico do ScreenTape no sistema TapeStation. A) A visão do gel é mostrada com DIN, indicando a integridade do gDNA de cada amostra. Amostras de gDNA de alta qualidade exibem uma única banda de alto peso molecular. Amostras degradadas aparecem como um esmagamento. B) Sobreposição de eletroferogramas de amostras de gDNA com diferentes níveis de degradação. Amostras de gDNA de alta qualidade exibem um pico nítido e amostras degradadas apresentam um esmagamento amplo.

O gDNA de entrada que atende aos padrões de qualidade é cisalhado para gerar fragmentos apropriados para o tipo de experimento. Os fluxos de trabalho SureSelect utilizam um sistema de cisalhamento ultrassônico da Covaris para fragmentar o gDNA. A biblioteca de gDNA cisalhado é então analisada nos sistemas TapeStation ou Bioanalyzer para verificar se os fragmentos apresentam uma distribuição de esfregaço única com tamanho mediano entre 150 e 200 pb (Figura 3).

A avaliação do tamanho e uniformidade do cisalhamento por meio dessa etapa é fundamental para estabelecer a linha de base para comparação de tamanho nas etapas subsequentes do protocolo de enriquecimento de alvo SureSelect. O cisalhamento desigual (Figuras 4A e 4B) pode ser o resultado de DNA de entrada de baixa qualidade ou DNA suspenso em tampão incorreto, diferente de TE. Também pode acontecer a partir de problemas instrumentais comumente encontrados, tais como:

- Baixo volume da amostra (Figura 4B)
- Permitir que um espaço com ar interfira na fragmentação
- Nível de água muito alto ou baixo
- Desgaseificação insuficiente
- Temperatura do banho-maria fora da faixa de 6 a 8 °C

Problemas nos instrumentos que levam à fragmentação incompleta também podem resultar em um intervalo maior de tamanhos (Figura 4C). DNA de entrada em excesso usado para cisalhamento leva ao cisalhamento inadequado e à ocorrência de caudas de pico (Figura 4D). A adesão às quantidades recomendadas de material de partida, otimizada para o cisalhamento da Covaris, ajuda a evitar tais conseqüências.

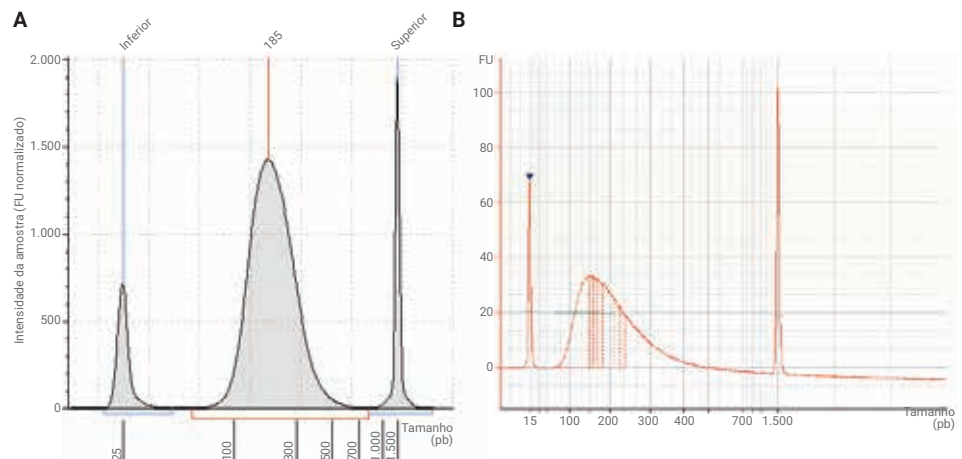


Figura 3. Padrão de eletroferograma de DNA cisalhado mostrando o tamanho máximo do pico entre 150 e 200 pb. A) Eletroferograma de gDNA cisalhado separado com o ensaio ScreenTape D1000 e o sistema TapeStation. B) Eletroferograma de gDNA cisalhado analisado com o ensaio DNA 1000 e o sistema Bioanalyzer.

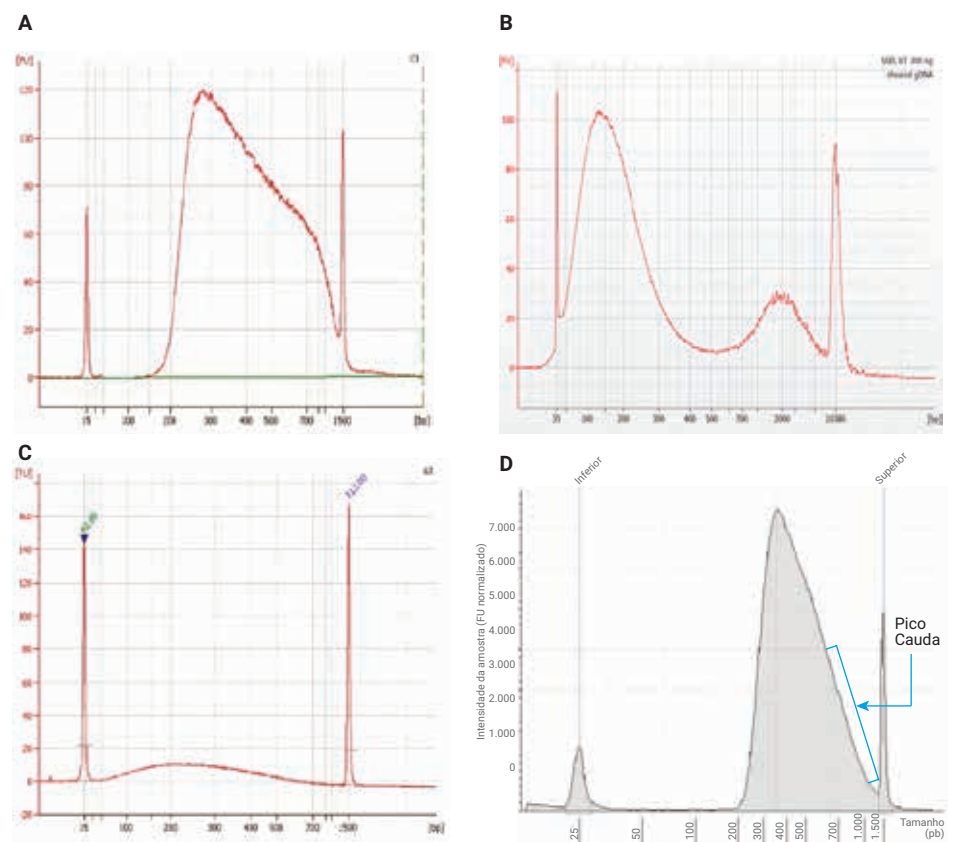


Figura 4. Padrão de eletroferograma de amostras de gDNA com cisalhamento anormal. A a C mostram eletroferogramas obtidos com o sistema Bioanalyzer. A) Amostra mostrando o cisalhamento desigual analisada com o ensaio de DNA 1000 B) Amostra com grande pico adicional analisada com o ensaio HS DNA. C) Eletroferograma mostrando o intervalo de tamanho maior obtido com o ensaio DNA 1000. D) Cauda no pico de uma amostra analisada com o ensaio ScreenTape D1000 e o sistema TapeStation.

Uma vez que as amostras tenham sido cisalhadas, elas são então reparadas na extremidade, adeniladas e ligadas ao adaptador. Depois que a ligação do adaptador é concluída, as bibliotecas são amplificadas. Em seguida, essas bibliotecas amplificadas após a ligação ao adaptador, ou bibliotecas amplificadas pré-capturadas, são avaliadas no sistema TapeStation ou Bioanalyzer para CQ da amostra.

Nesta etapa, espera-se uma mudança de tamanho de aproximadamente 60-80 pb com o SureSelect^{XT} (Figura 5) e 80-100 pb com o SureSelect^{XT2} (Figura 6) em relação à biblioteca pós-cisalhada. A diferença no tamanho resulta dos índices anexados aos adaptadores no SureSelect^{XT2}, que adiciona bases extras em comparação com o SureSelect^{XT}. A ligação do adaptador geralmente não é 100% eficiente, portanto o ensaio ScreenTape D1000, com o sistema TapeStation, ou o ensaio DNA 1000, com o sistema Bioanalyzer, pode ser usado para visualizar a mudança de tamanho após a ligação bem-sucedida dos adaptadores, pois uma ligação ineficiente do adaptador resultará na redução da complexidade da biblioteca após o PCR¹. A mudança de tamanho esperada indica uma adição bem-sucedida dos adaptadores, assim como um enriquecimento ideal daqueles fragmentos ligados ao adaptador através da amplificação. Durante esta etapa do CQ, é importante quantificar a biblioteca com base no intervalo de tamanho esperado para garantir que haja uma quantidade adequada de acordo com o protocolo escolhido para a etapa subsequente da captura da biblioteca; observe também a presença de adaptadores em excesso, que deve ser inferior a 10% da biblioteca principal (Figura 7).

Os adaptadores livres são tipicamente resultantes de ligação ineficiente devido ao excesso de DNA de entrada, problemas de reagentes ou temperaturas de incubação abaixo do ideal para a ligação. Durante a etapa de amplificação, podem ser observados artefatos de PCR decorrentes de amplificação excessiva (Figuras 8A e 8B)⁵ e dímeros de primer (Figura 8E). Ao trabalhar com pequenas quantidades de DNA, os dímeros de primer podem ser removidos através da realização de etapas adicionais de limpeza com esferas (beads) SPRI ou seleção de tamanhos à base de gel.

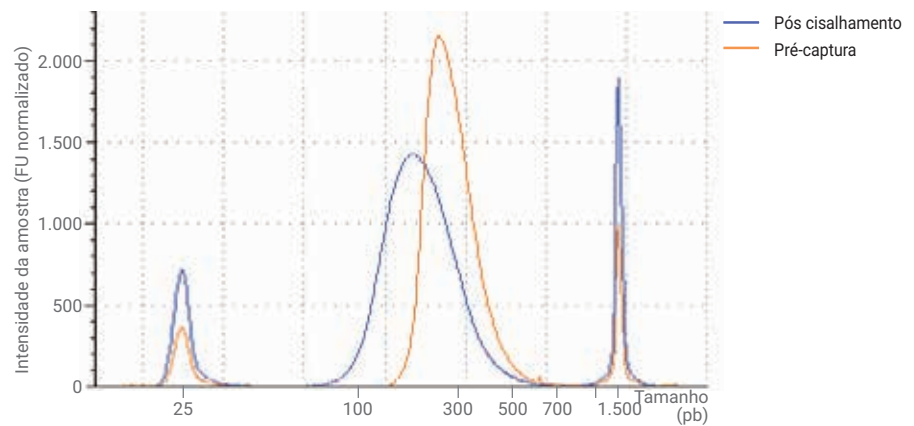


Figura 5. Sobreposição de eletroferogramas de bibliotecas de cisalhamento purificado (azul) e com ligação a adaptador purificadas (laranja) mostrando uma mudança de tamanho de 60-80 pb em bibliotecas de pré-captura amplificadas SureSelect^{XT} em relação a bibliotecas pós-cisalhamento analisadas com o ensaio ScreenTape D1000 e o sistema TapeStation.

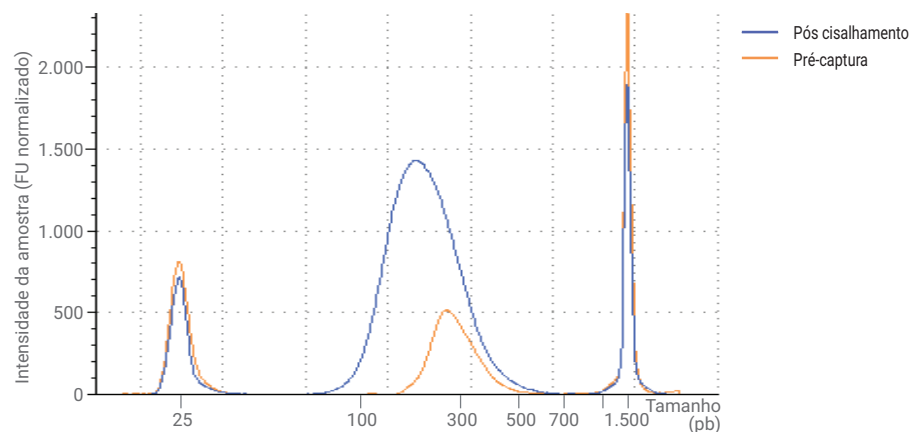


Figura 6. Sobreposição de eletroferogramas de bibliotecas de cisalhamento purificado (azul) e com ligação a adaptador purificadas (laranja) mostrando uma mudança de tamanho de 80-100 pb em bibliotecas de pré-captura amplificadas SureSelect^{XT2} em relação a bibliotecas pós-cisalhamento obtidas com o ensaio ScreenTape D1000 e o sistema TapeStation.

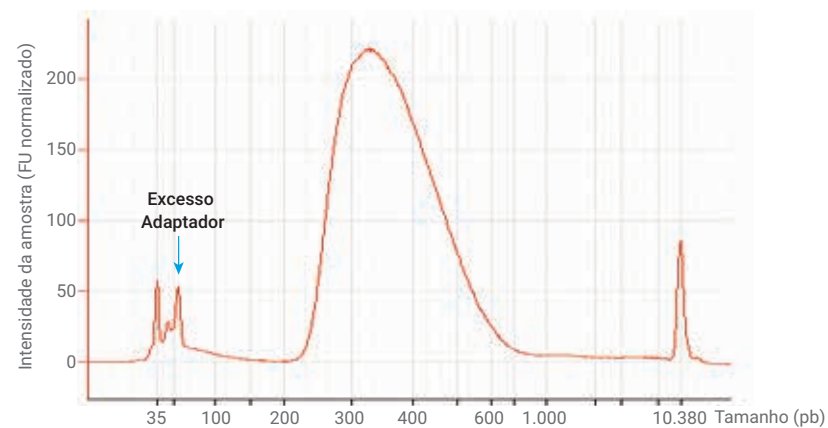


Figura 7. Padrão de eletroferograma da biblioteca amplificada de pré-captura com ligação a adaptador do fluxo de trabalho de enriquecimento de alvo SureSelect mostrando excesso de adaptador, próximo ao marcador inferior do ensaio HS DNA, analisado com o sistema Bioanalyzer.

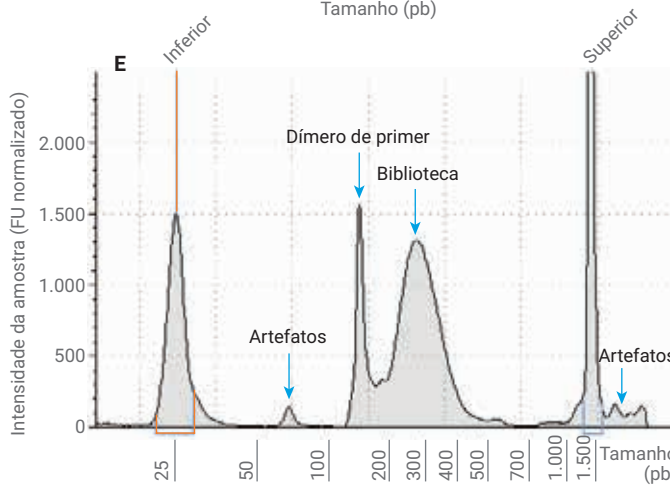
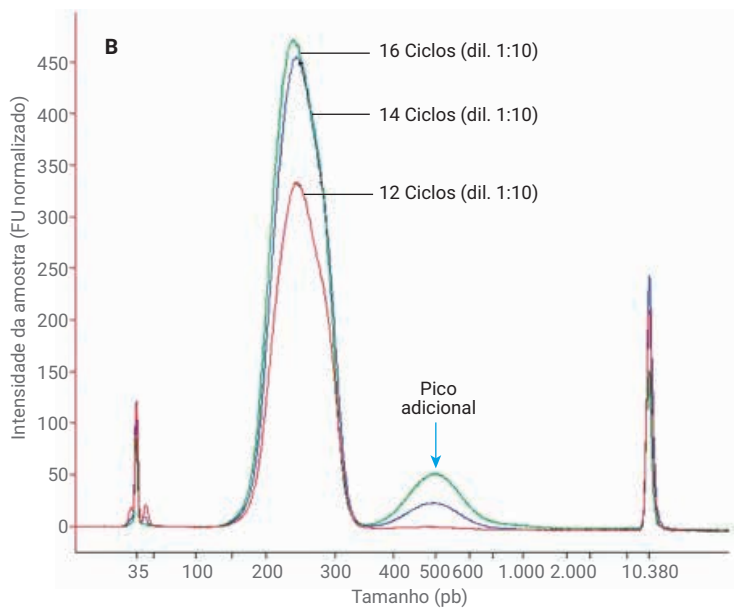
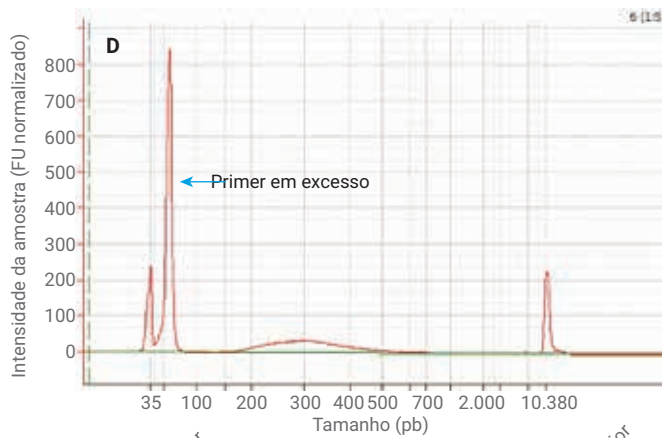
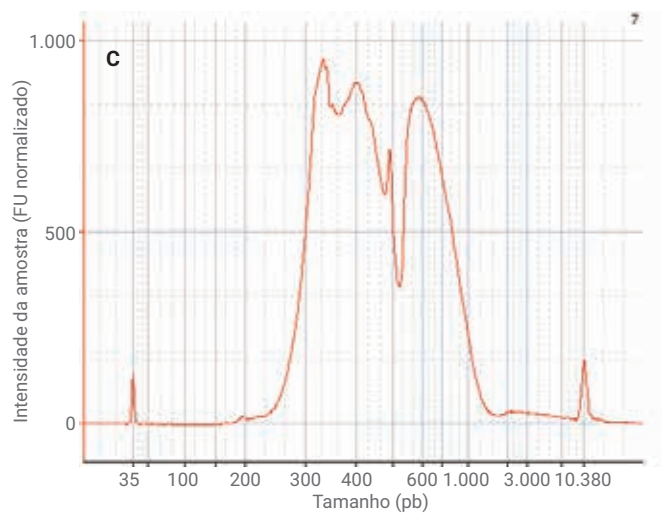
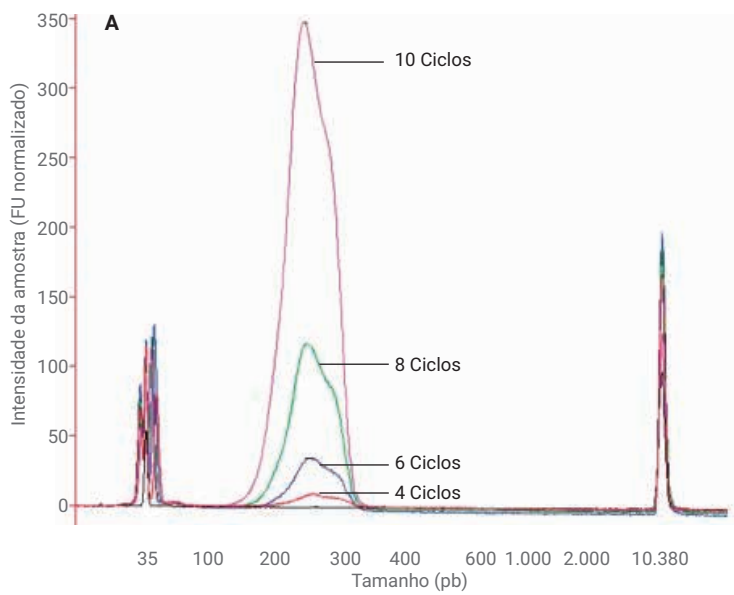


Figura 8. Padrão de eletroferograma de artefatos em bibliotecas de DNA amplificadas por PCR derivadas do fluxo de trabalho de enriquecimento de alvo SureSelect. A a D mostram eletroferogramas obtidos com o ensaio HS DNA e o sistema Bioanalyzer. A) Sobreposição de eletroferogramas após 4 a 10 ciclos de PCR, bem como o branco de tampão TE (preto), mostrando aumento progressivo na concentração de DNA com maior número de ciclos. B) Sobreposição de eletroferogramas obtidos após 12 a 16 ciclos de PCR. Ao usar 10 ou mais ciclos, a concentração de DNA fica fora da faixa quantitativa do ensaio HS DNA. Portanto, as amostras devem ser diluídas com tampão TE nas proporções de diluição indicadas, antes da análise no sistema Bioanalyzer. Perda de aumento linear de concentração de DNA, saturação de DNA e pico adicional observado com 14 ciclos ou mais. C) Picos divididos por sobrecarga do sistema Bioanalyzer. D) Amostra mostrando excesso de primer e baixo rendimento. E) Biblioteca analisada com o ensaio ScreenTape HS D1000 e o sistema TapeStation apresentando dímeros de primer e artefatos de PCR. Dímeros de primer aparecem como um pico nítido abaixo do tamanho esperado da biblioteca, e artefatos podem ser encontrados ao longo do traço.

A redução do número de ciclos de PCR pode ajudar a impedir que os picos e artefatos ilegítimos sejam excessivamente amplificados. Ciclos de PCR ineficientes podem resultar em baixo rendimento e excesso de primers (Figura 8D). Isso pode ser resultado de má ligação ao adaptador, baixa qualidade do DNA, limpeza ineficiente pelas esferas, uso de muito poucos ciclos ou termociclador mal calibrado. A Figura 8C mostra que a sobrecarga de DNA nos chips do Bioanalyzer pode causar um pico dividido.

O último ponto de CQ é determinar a distribuição de tamanho da biblioteca final, que é a biblioteca pós-capturada amplificada, porque o sequenciamento daqueles que não se enquadram na distribuição de tamanho recomendada pode levar a um enriquecimento deficiente das regiões-alvo. Essas bibliotecas são resultado da hibridação da biblioteca amplificada pré-capturada com um conjunto de probes, seguido por uma captura subsequente por esferas magnéticas revestidas com estreptavidina. Esses pares hibridizados ligados são então lavados através de uma série de lavagens estridentes para remover sequências não específicas, e são então amplificados. Essa amplificação serve para garantir que uma quantidade suficiente de biblioteca tenha sido gerada para o sequenciamento e, no caso do SureSelect^{XT}, para adicionar índice de amostra para multiplexação. Adicionar os índices nesse ponto resulta em um deslocamento adicional de 20 a 30 pb no pico da amostra (Figura 9).

Problemas semelhantes à dimerização e amplificação excessiva do primer descritos acima podem ser observados nesta etapa também. Além disso, o carryover de esferas após a limpeza do DNA por PCR pode afetar a avaliação bem-sucedida das bibliotecas. Esferas residuais podem migrar juntamente com o marcador superior e podem afetar o dimensionamento e a quantificação das amostras (Figura 10). Em tais situações, pode ser útil usar um ímã forte para separar as esferas e pipetar cuidadosamente para evitar movimentar as esferas. Baixos rendimentos após PCR pós-captura podem indicar condições de hibridação sub-ótimas, juntamente com outras razões discutidas

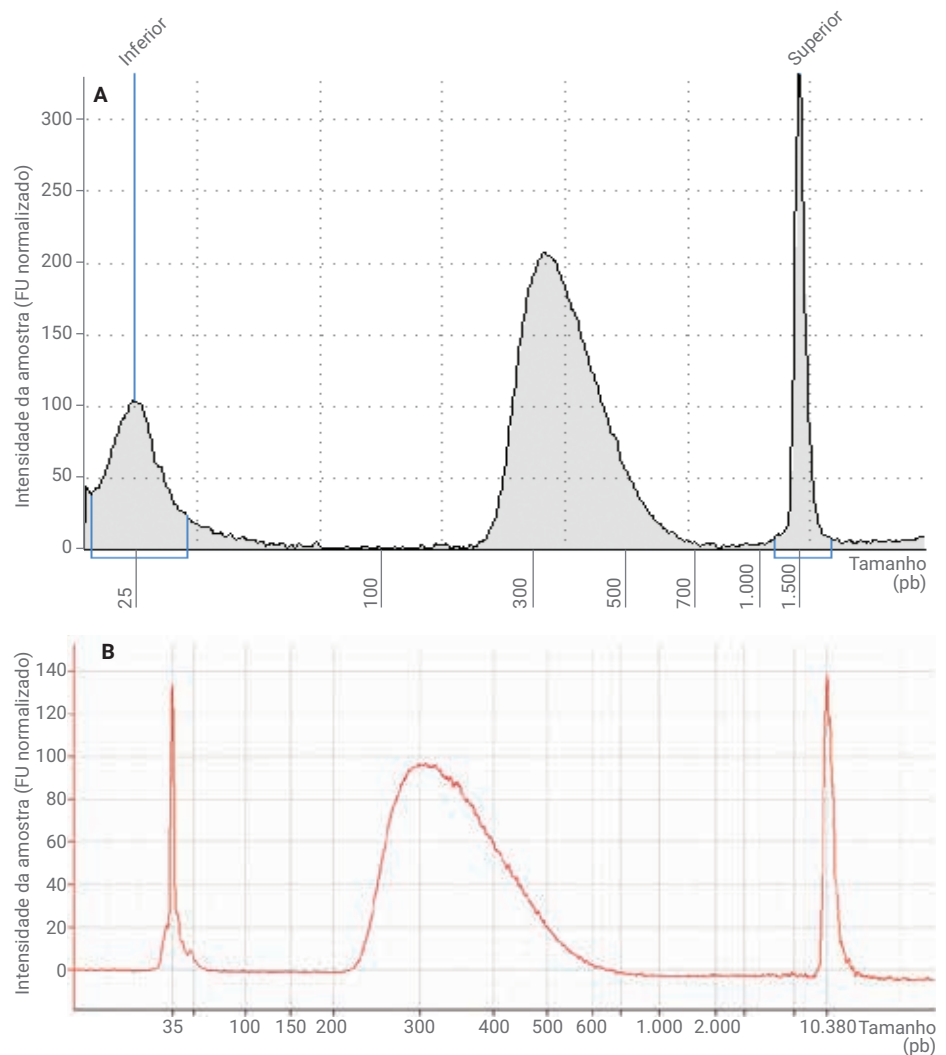


Figura 9. Padrão de eletroferograma de bibliotecas pós-captura amplificadas SureSelect^{XT} e SureSelect^{XT2} mostrando o tamanho máximo de pico entre 250 e 350 pb. A) Biblioteca de DNA amplificada pós-capturada separada com o ensaio ScreenTape HS D1000 do TapeStation e o sistema TapeStation. B) Biblioteca de DNA amplificada pós-capturada analisada com o ensaio HS DNA e o sistema Bioanalyzer.

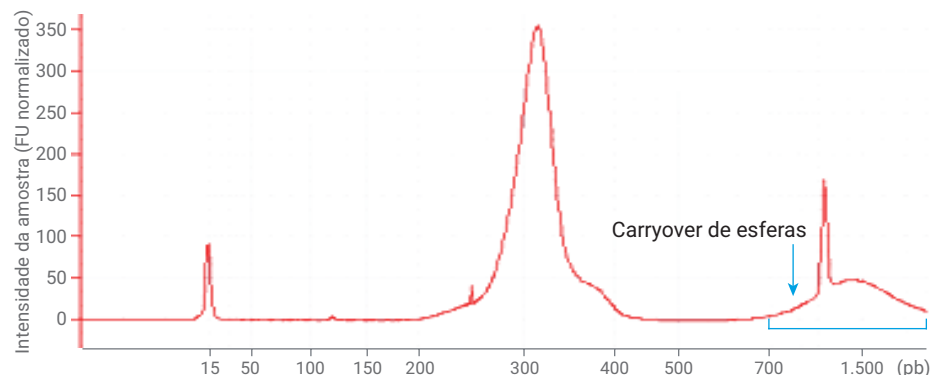


Figura 10. Padrão de eletroferograma da biblioteca pós-captura do fluxo de trabalho de enriquecimento de alvo SureSelect mostrando carryover de esferas magnéticas, obtido com o ensaio DNA 1000 e o sistema Bioanalyzer.

anteriormente (Figura 8D). É útil assegurar que uma evaporação excessiva não tenha ocorrido durante a etapa de hibridação, e prosseguir com o sequenciamento apenas quando houver DNA suficiente presente. Os usuários frequentemente agrupam amostras de bibliotecas neste estágio com base em concentrações molares para aplicações de sequenciamento. Os dados obtidos com os sistemas Bioanalyzer e TapeStation fornecem informações sobre molaridade e distribuição de tamanho e podem ser usados para estimar o percentual de dímeros de primer, que são parâmetros críticos para a avaliação da biblioteca final.

SureSelect^{QXT}

O SureSelect^{QXT} é um método de preparo de bibliotecas mediado pela transposase (Figura 1B), que também possui três pontos principais de controle de qualidade, como o SureSelect^{XT} e o SureSelect^{XT2}. A integridade do DNA é essencial para os métodos de preparo de bibliotecas baseados na transposase, devido à necessidade da transposase de cortar e ligar em dois pontos em uma única fita de DNA. O SureSelect^{QXT} não é recomendado para DNA de baixa integridade, como DNA de amostras FFPE. Para o SureSelect^{QXT}, um DIN >8 é recomendado para entradas de gDNA, como representado nas faixas E2 a H2 da Figura 2A. O ponto de CQ após PCR pré-captura avaliará o sucesso da reação da transposase, como demonstrado nas Figuras 11A e 11B. Pode-se observar também variação dos perfis de fragmentação, como mostrado na Figura 11C. Os picos que aparecem em tamanhos inferiores a 245 pb podem indicar uma quantidade de entrada menor do que a estimada e podem estar associados a um aumento de repetições nos dados de sequenciamento. Em contraste, um pico de tamanho de fragmento de DNA significativamente maior que 325 pb pode indicar excesso de gDNA na reação de fragmentação, e pode estar associado à diminuição do desempenho de percentual no alvo nos resultados do sequenciamento (Figura 11C)⁶.

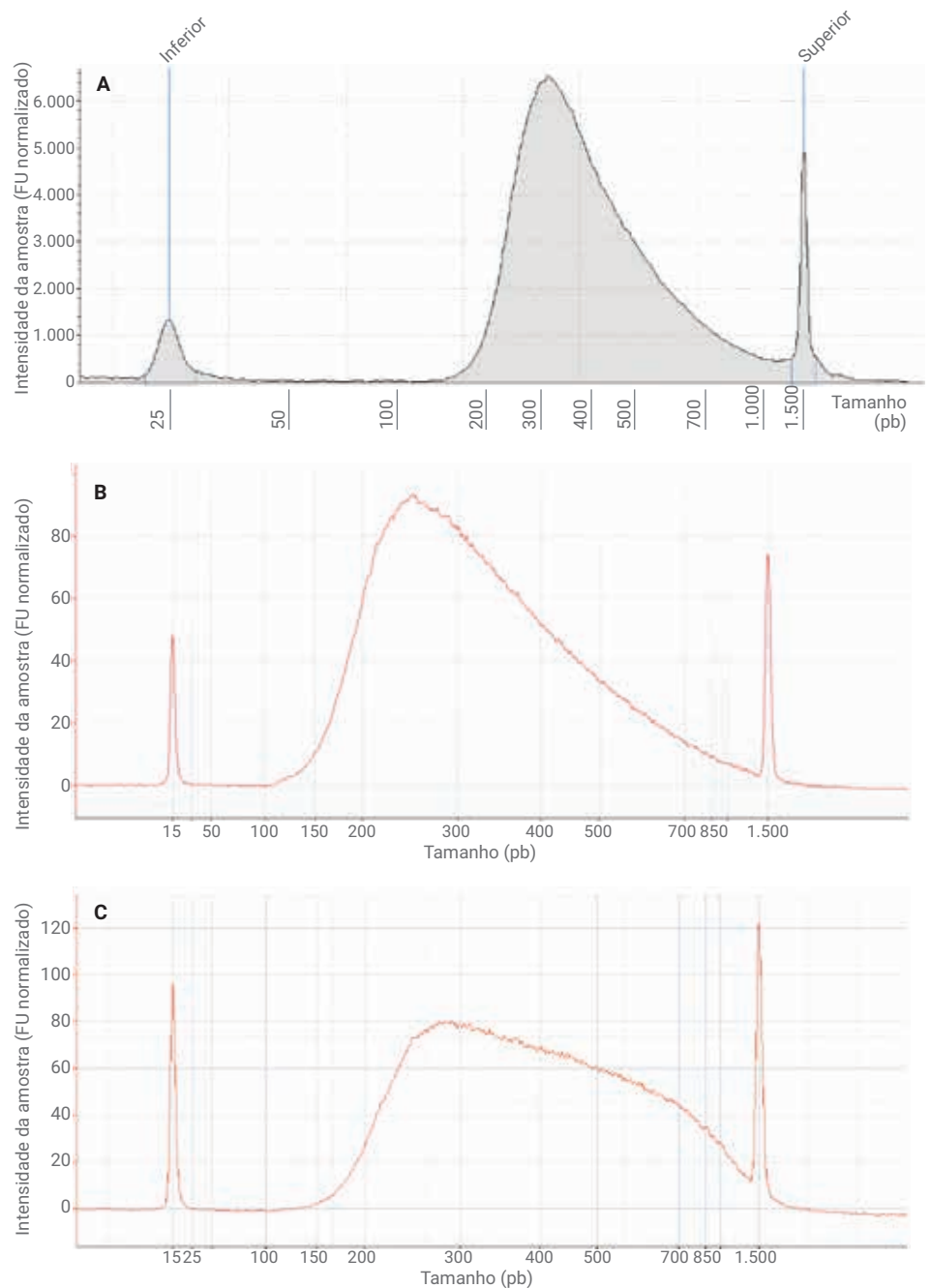


Figura 11. Padrão de eletroferograma de bibliotecas de pré-captura amplificadas SureSelect^{QXT} mostrando o tamanho máximo de pico entre 245 e 325 pb. A) Biblioteca de DNA amplificada pré-captura separada com o ensaio ScreenTape D1000 e o sistema TapeStation. B) Biblioteca de DNA amplificada pré-captura analisada com o ensaio DNA 1000 e o sistema Bioanalyzer. C) Variação na biblioteca de DNA amplificado pré-captura com ensaio de DNA 1000.

Em um experimento bem-sucedido, a biblioteca final mostra um pico entre 325 pb e 450 pb (Figura 12). Semelhante aos fluxos de trabalho SureSelect^{XT} e SureSelect^{XT2}, além de garantir rendimento suficiente para o sequenciamento, verifique a presença de sinais de dímeros de primers e amplificação excessiva na amostra.

HaloPlex e HaloPlex^{HS}

A tecnologia de enriquecimento de alvo HaloPlex e HaloPlex^{HS} usa uma abordagem baseada em amplicon, ao contrário da fragmentação aleatória usada nos fluxos de trabalho do SureSelect. A amostra inicial de gDNA humano é digerida individualmente por oito pares únicos de enzimas de restrição gerando fragmentos (amplicons) com sequências esperadas. Estes fragmentos são subsequentemente reunidos e combinados com probes projetadas para hibridizar até as extremidades de seus fragmentos-alvo, formando uma estrutura circular conhecida como Halo. (Figura 13). Em seguida, o cassete de indexação, transportando a sequência de indexação e a sequência do adaptador parcial, é guiada pela probe para ligar entre as extremidades do fragmento-alvo. Isto gera um fragmento em anel como o molde para o PCR, produzindo o amplicon-alvo amplificado com sequências de adaptador completas.

A integridade do DNA de entrada é fundamental para o sucesso do preparo de bibliotecas com HaloPlex e HaloPlex^{HS}, que se baseia no corte do gDNA intacto para gerar fragmentos-alvo. É necessário utilizar amostras de gDNA de alta qualidade, verificadas por razão de densidade óptica (OD) 260/280 e distribuição de tamanhos em gel de eletroforese, como indicado no protocolo. O uso de DNA FFPE é recomendado somente após incorporar modificações baseadas na pontuação de qualidade do ddCq obtida usando o kit de CQ Agilent NGS FFPE (G9700-90000).

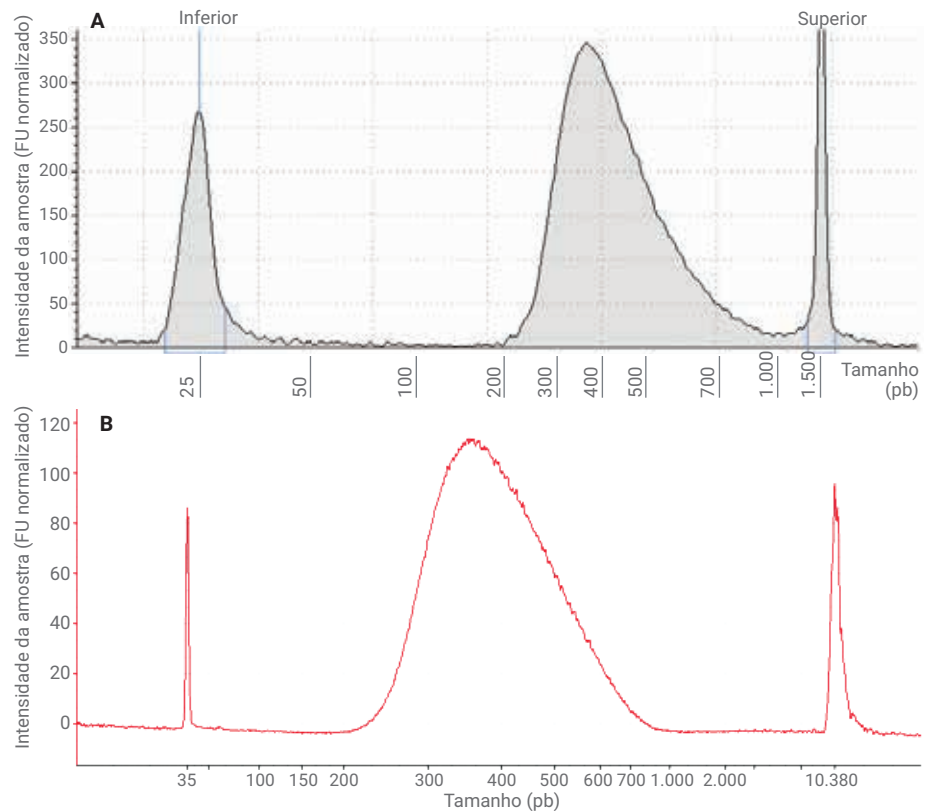


Figura 12. Padrão de eletroferograma de bibliotecas amplificadas pós-captura SureSelect^{QXT} mostrando o tamanho máximo de pico entre 325 e 450 pb. A) Biblioteca de DNA amplificada pós-captura separada com o ensaio ScreenTape HS D1000 e o sistema TapeStation. B) Biblioteca de DNA amplificada pós-captura com o ensaio HS DNA e o sistema Bioanalyzer.

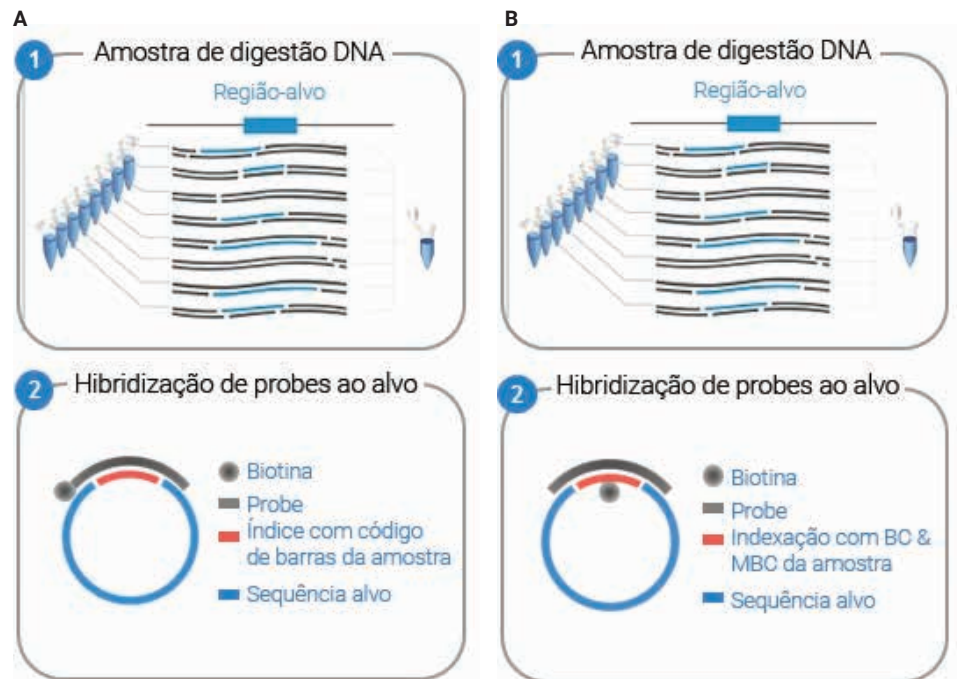


Figura 13. Esquema de uma estrutura de halo a partir dos fluxos de trabalho HaloPlex (A) e HaloPlex^{HS} (B) formados pelo fragmento de DNA alvo, probe e sequência de indexação.

A digestão de restrição do gDNA produz um esfregaço, dificultando determinar o sucesso da digestão. Portanto, uma amostra de DNA de controle do enriquecimento (ECD) é fornecida para ser digerida junto com amostras experimentais para verificar a atividade das enzimas de restrição. O ECD de controle é uma mistura de gDNA de alta

qualidade e um produto de PCR de 800 pb que contém sítios de restrição para todas as enzimas utilizadas. Para validar a digestão de restrição (Figura 14), uma alíquota de cada um dos oito controles de ECD duplamente digeridos, juntamente com uma alíquota do ECD de controle não digerido, é corrida no sistema TapeStation ou Bioanalyzer.

A digestão parcial resulta em uma banda menor, ausência de qualquer uma das bandas esperadas, ou a presença de uma banda não digerida importante, que pode ter um impacto no resultado do enriquecimento (Figura 15).

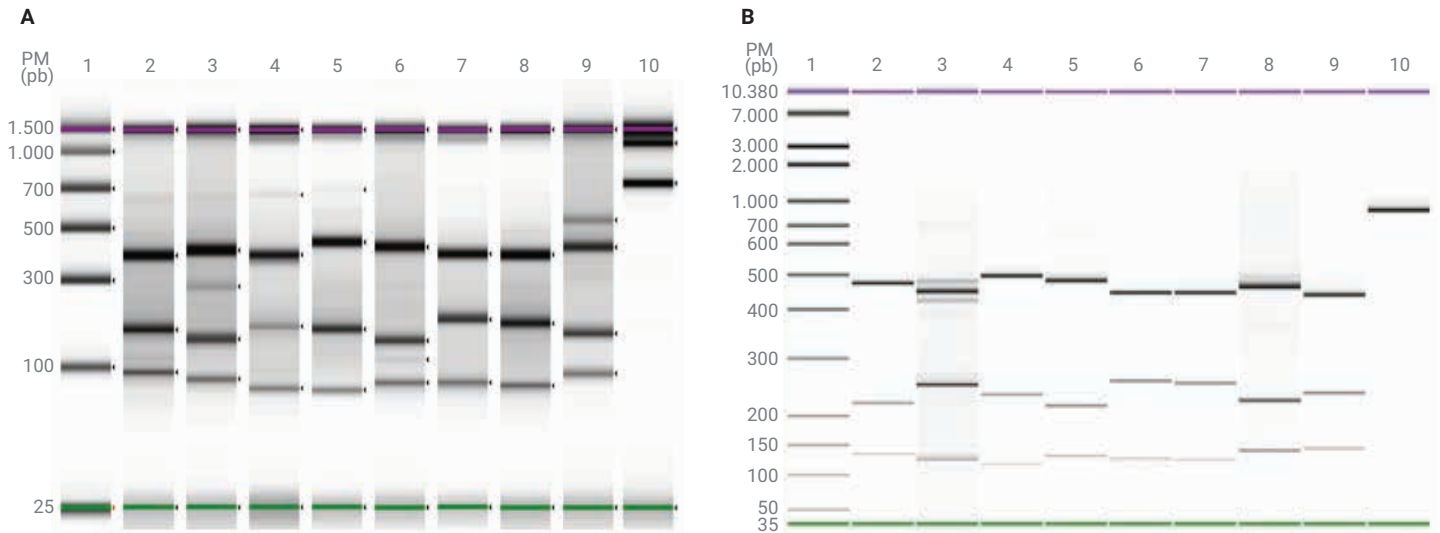


Figura 14. Imagens de gel da digestão de ECD do fluxo de trabalho de enriquecimento de alvo HaloPlex. Faixa 1: Escada de DNA, Faixas 2 a 9: Reações de digestão de ECD A-H, Faixa 10: DNA de controle de enriquecimento não digerido. A amostra digerida com sucesso mostra três bandas proeminentes a aproximadamente 125, 225 e 450 pb no topo de um esfregaço de gDNA entre 100 e 2.500 pb. Os tamanhos precisos das três bandas serão diferentes após a digestão em cada uma das oito misturas principais de enzimas de restrição. É normal observar bandas menores adicionais com abundância relativa semelhante à faixa 3. A) Digestão de restrição de ECD pelo ensaio ScreenTape HS D1000 e pelo sistema TapeStation. B) Digestão de restrição ECD pelo ensaio HS DNA e pelo sistema Bioanalyzer

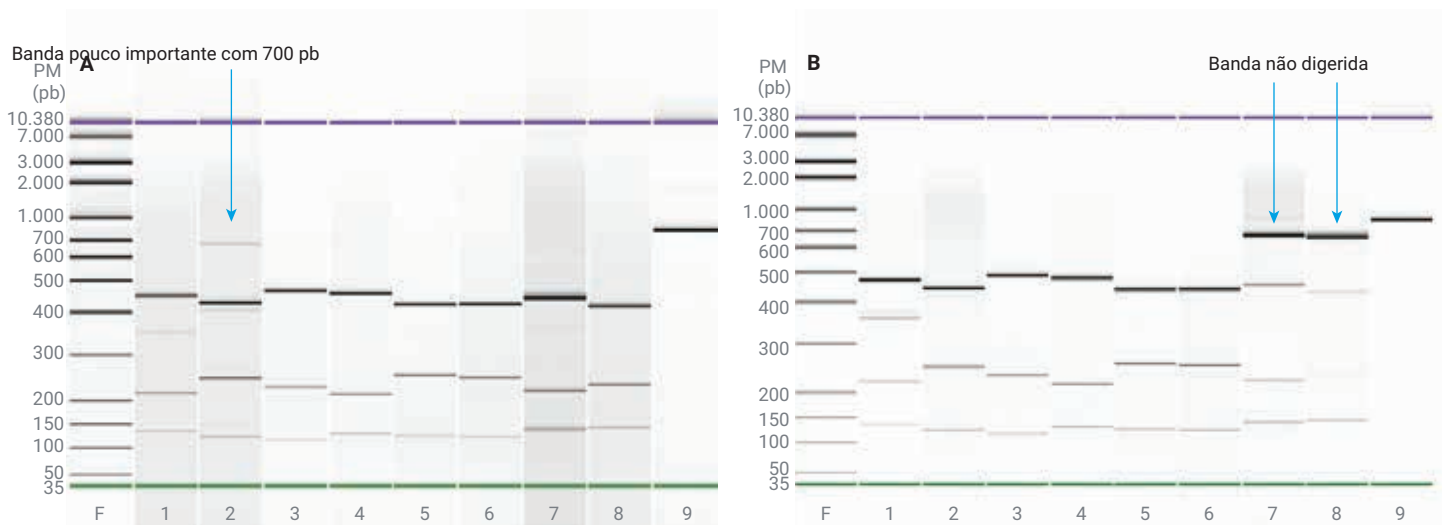


Figura 15. Imagens em gel da digestão parcial ECD do fluxo de trabalho de enriquecimento de alvo HaloPlex analisadas com o ensaio HS DNA e o sistema Bioanalyzer. A) Banda menos importante com 700 pb na faixa 2. B) Banda importante não digerida nas faixas 7 e 8.

As bibliotecas finais dos fluxos de trabalho HaloPlex e HaloPlex^{HS} mostram um perfil com um esfregaço característico na faixa de 175 a 625 pb (Figuras 16A e 16B) e 190 a 545 pb, respectivamente (Figuras 16C e 16D).

O aspecto do perfil pode variar devido a modelos de biblioteca específicos, bem como à qualidade geral do material de entrada. Cada novo lote de um kit personalizado é fornecido com uma imagem de traço da biblioteca do

Bioanalyzer gerada internamente como parte do processo de CQ para kits personalizados específicos HaloPlex e HaloPlex^{HS}, usando uma amostra de DNA de alta qualidade.

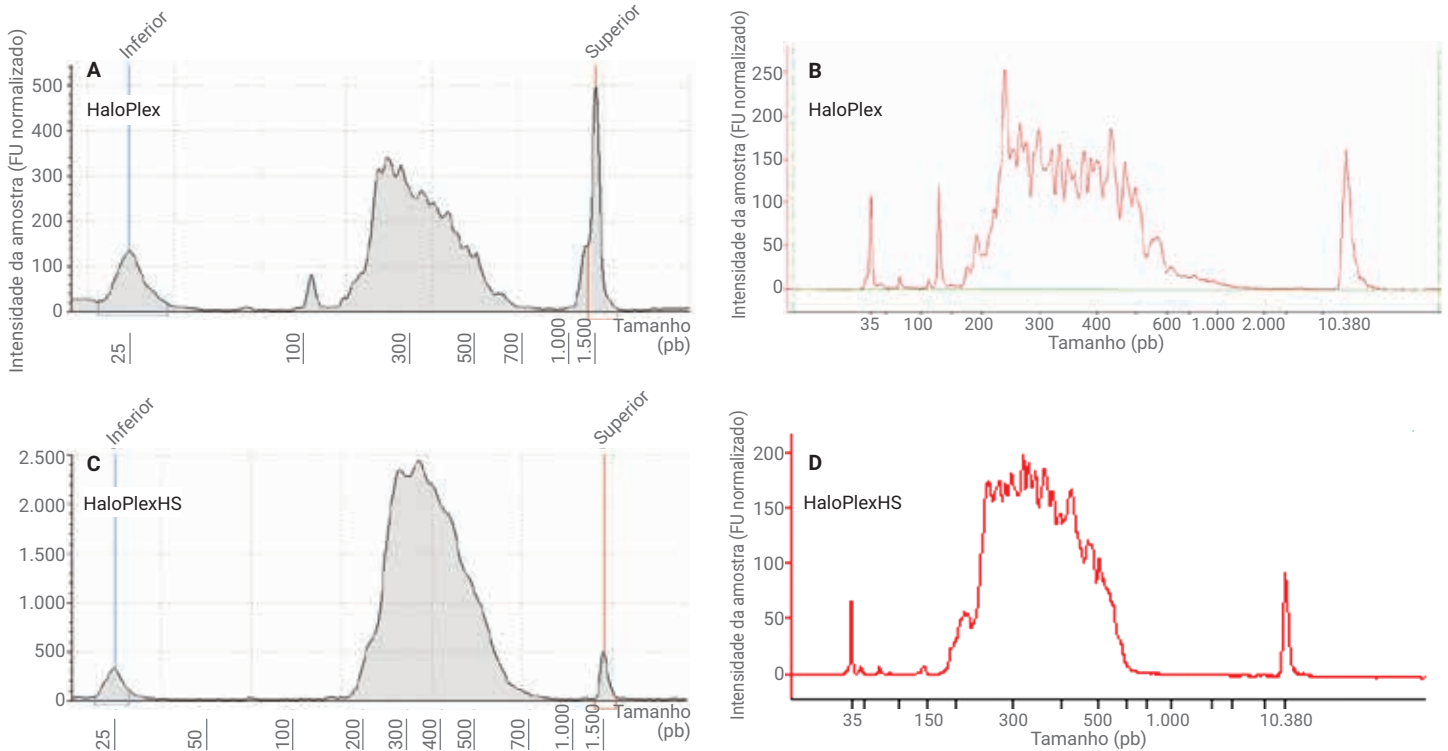


Figura 16. Padrão de eletroferograma das bibliotecas finais HaloPlex and HaloPlex^{HS}. (A) e (B) padrão de biblioteca HaloPlex com esfregaço na faixa de 175 a 625 pb. (C) e (D) padrão de biblioteca HaloPlex^{HS} com esfregaço na faixa de 190 a 545 pb. As bibliotecas foram analisadas com o ensaio ScreenTape HS D1000 e o sistema TapeStation (A e C) ou o ensaio HS DNA e o sistema Bioanalyzer (B e D).

Um problema comum visto nas bibliotecas HaloPlex e HaloPlex^{HS} são artefatos com tamanhos menores que 150 pb (Figura 17). Picos de artefatos de aproximadamente 120 pb para HaloPlex e aproximadamente 140 pb para HaloPlex^{HS} estão relacionados a dímeros de primers que podem se agrupar e

consumir espaço de sequenciamento e não devem ser incluídos na quantificação da biblioteca. Se o pico for maior que 10% do total do produto gerado, a remoção do primer através de uma rodada adicional de purificação do AMPure é altamente recomendada.

Um declínio acentuado na extremidade de alto peso molecular das bibliotecas HaloPlex pós-captura em comparação com o padrão esperado da biblioteca pode ser visto com amostras de DNA de FFPE de baixa qualidade, ou inadequações introduzidas pelo usuário no protocolo de preparo da biblioteca (Figura 18).

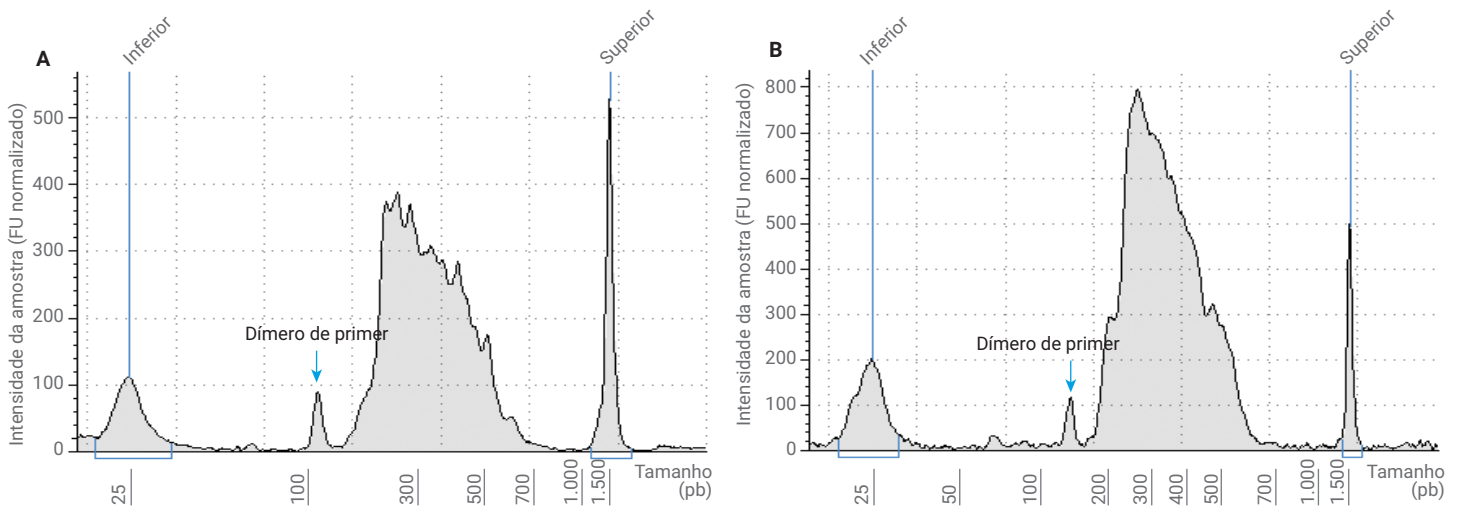


Figura 17. Padrão de eletroferograma de dímeros de primer na biblioteca final HaloPlex e HaloPlex^{HS} obtido com o ensaio ScreenTape HS D1000 e o sistema TapeStation. A) Biblioteca HaloPlex mostrando o dímero de primer com 120 pb. B) Biblioteca HaloPlex^{HS} com dímero de primer com 145 pb.

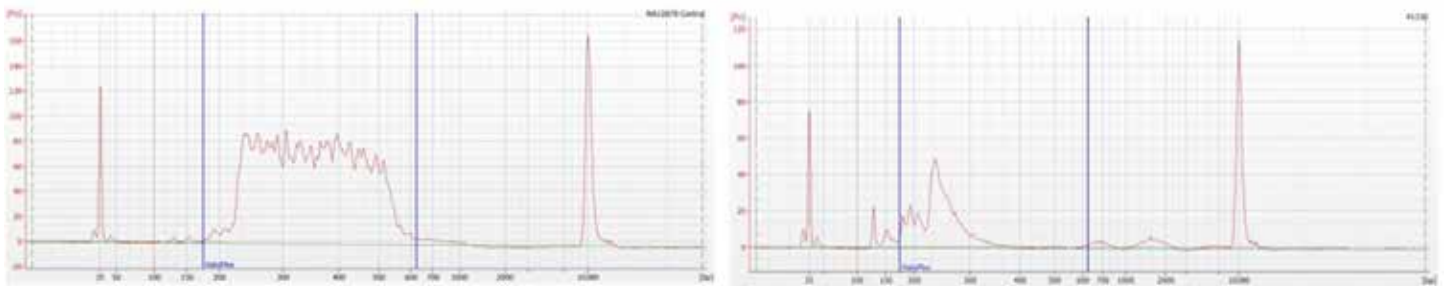


Figura 18. Padrão de eletroferograma da biblioteca de DNA FFPE do protocolo de enriquecimento de alvo HaloPlex analisado com ensaio de HS DNA e o sistema Bioanalyzer. A) Perfil normal de biblioteca de DNA FFPE. B) Decréscimo acentuado com alto peso molecular observado em amostras de FFPE de baixa qualidade, mistura inadequada de reações de digestão individuais na solução de hibridização levando à inativação inadequada das enzimas de restrição, ou secagem excessiva das esferas AMPure no momento da remoção do tampão de hibridização no fluxo de trabalho HaloPlex^{HS}.

Conclusão

Para assegurar o preparo bem-sucedido da biblioteca de NGS, é importante monitorar as amostras em várias etapas, da aquisição à biblioteca de sequenciamento. Conhecer o resultado esperado em diferentes etapas do CQ fornece aos usuários um ponto de referência e confiança na geração de bibliotecas de alta qualidade durante todo o processo. Isso é fundamental para garantir dados confiáveis de sequenciamento. Além disso, é importante entender os possíveis desvios e suas causas, o que facilitará uma rápida avaliação e retificação. Esta nota de aplicação aborda o exposto acima e demonstra a utilidade de duas plataformas de eletroforese automatizadas, os sistemas TapeStation e Bioanalyzer, em vários pontos de verificação de controle de qualidade em todo o portfólio de produtos de NGS da Agilent. Observe que essas representações não incluem todos os resultados possíveis e é possível observar resultados diferentes daqueles discutidos aqui.

Referências

1. A. Padmanaban, End to End Sample Quality Control for Next Generation Sequencing Library Preparation and SureSelect Target Enrichment on the Agilent 2200 TapeStation System, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-3654EN, **2014**.
2. M. Gassman, B. McHoull, DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System and the Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-5258EN, **2014**.
3. J. Petersen, *et al.* Use of the Agilent 4200 TapeStation System for Sample Quality Control in the Whole Exome Sequencing Workflow at the German Cancer Research Center (DKFZ), *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7615EN, **2016**.
4. A. Padmanaban, DNA Integrity Number (DIN) For the Assessment of Genomic DNA Samples in Real-Time Quantitative PCR (qPCR) Experiments, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6368EN, **2015**.
5. K. Gromadski, *et al.* Improving sample quality for SureSelect target enrichment and next-generation sequencing with the High Sensitivity DNA kit, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5008EN, **2009**.
6. E. Graf, Quality Control for Agilent SureSelect^{QXT} WGS Library Preparation, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8191EN, **2017**.

www.agilent.com/chem

Somente para uso em pesquisas. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico.

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impresso nos EUA, 1 de dezembro de 2018
5994-0127PTBR

