微芯片电泳仪 MultiNA

在新一代测序仪（NGS）文库质量控制（QC）中的应用

1 前言

随着新一代测序仪（NGS）的技术发展，其使用范围已扩展到de novo测序、变异、外显子组和基因表达分析等领域。因为可以对应高要求的分析处理能力，所以得以迅速普及。为了得到良好的测序结果，需要掌握NGS文库的大小分布和浓度，因此，在使用NGS系统时质控文库的以上信息非常重要。到目前为止，为了确认NGS文库的大小分布，使用琼脂糖凝胶电泳作为主要手段。为了确认浓度，还需要配备实时荧光定量PCR仪和荧光分光光度计。从文库制备到质量控制的操作是一系列复杂的手工作业，需要使用快速、简便且价格低廉的控制方法。而且，随着使用Index标签序列可同时对多个样品进行测序技术的成熟，进行质量控制的文库数量有所增加，需求会变得更多。

2 岛津解决方案概述

为解决上述需求，岛津使用全自动电泳仪MCE-202 MultiNA进行NGS文库的质量控制，使用本方法可同时得到文库的片段长度和浓度，操作简便，速度快。这里展示对小鼠的RNA序列进行分析的示例。

3 实验结果和讨论

在NGS文库的质量控制过程中，使用MultiNA的弥散（smear）分析软件能够计算出文库的预计平均大小、浓度和摩尔浓度（图1、2）。通过与实时PCR的定量进行比较，可知MultiNA的定量浓度虽然相对较低但定量结果稳定（表1）。在小鼠的RNA测序结果中，也得到了足够的读取长度和Index标签序列的各文库间稳定的读取率（表2）。由上述结果可知，不仅可以在MultiNA的文库质量控制中确认大小分布，还能够在常规分析中同时进行定量。使用MultiNA可最多对108个文库自动进行电泳和分析。并且，实际操作时间可缩短10～20分钟。特别是NGS文库有所增加时，将MultiNA应用到文库质量控制中，可快速简便地进行质量控制。

图1　NGS流程和MultiNA文库质量控制

图2　NGS文库的电泳示例

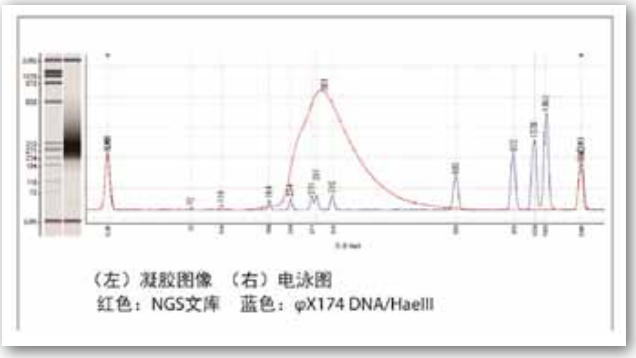

表1　MultiNA 和实时PCR 的浓度定量结果

Library No.	MultiNA [nmol/L]	GVP-9600 (q-PCR) [nmol/L]	Ratio [MultiNA/GVP-9600]
1	121.1	167.3	72.4 %
2	126.9	145.1	87.5 %
3	54.1	57.8	93.6 %
4	214	292.3	73.2 %
5	187.4	226.8	82.6 %
6	166.3	229.3	72.5 %
7	206	256.8	80.2 %
8	158.7	181.9	87.3 %
		Average	81.2 % (CV 9.9 %)

表2　使用MultiNA对4个进行质量控制文库的NGS结果

簇密度	548 K / mm²	总读取数	151.5 M reads
读取数（过滤处理后）	143.3 M reads	≧Q30 比率	95.9 %
4 个文库的读取率	21.2 % - 26.2 %（4 个文库/用 Index 标签序列对 1 个通道排序：理论值 25 %）		

4 实验方法

4.1 试剂和样品

DNA-1000试剂盒（岛津制作所）P/N292-27911-91

SYBR® Gold（Life Technologies）S11494

ϕX174 DNA/HaeIII Markers（Promega）G1761

4.2 与实时PCR的浓度定量结果的比较分析步骤

4.2.1 小鼠的TotalRNA（8个样品）由利用Clontech公司的SMARTer Ultra Low RNA kit制备cDNA扩增产物得到。

4.2.2 根据Illumina公司的方法，分享cDNA扩增产物后，使用TruSeq DNA sample prep kit制备NGS文库。

4.2.3 使用MultiNA通过DNA-1000试剂盒分析同一文库后，根据弥散（smear）分析软件对浓度进行定量。

4.2.4 将MultiNA的浓度定量结果和同一样品的实时PCR（岛津公司GVP-9600）的浓度定量结果进行比较。

4.3 使用新一代测序仪进行测序

4.3.1 使用Illumina公司的TruSeq RNA sample prep kit，制备小鼠的NGS文库的4个样品。

4.3.2 使用MultiNA通过DNA-1000试剂盒分析同一文库后，根据弥散（smear）分析软件确认范围并进行定量。

4.3.3 使用Illumina公司的HiSeq 1000进行测序。

5 成本核算

微芯片电泳MultiNA分析成本核算如表3所示。

表3 成本核算

试剂名称	生产公司和货号	每个样品分析成本（元）
DNA-1000 Reagent Kit for MultiNA	（岛津制作所）292-27911-91	1.25
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	（Invitrogen）S-11494	0.004
ϕX174 DNA/HaeIII Markers Promega	（Promega）G1761	0.01
合 计		1.264

本成本核算仅供参考。