

# Application News

## No. B52

微芯片电泳法  
Microchip Electrophoresis

### 在新一代测序仪（NGS）文库 质量控制（QC）中的应用

Application of Next Generation Sequencer (NGS) to Quality Control (QC)

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，需求会变得更加多。

为解决上述需求，本文将向您介绍使用全自动电泳仪 MCE-202 MultiNA 在 NGS 文库的质量控制应用中，对小鼠的 RNA 序列进行分析的示例。

#### ■ 分析方法

Experimental Procedure

##### 【与实时 PCR 的浓度定量结果比较】

- 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。
- 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。
- 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\*1 对浓度进行定量。
- 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。

##### 【使用新一代测序仪进行测序】

- 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。
- 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。
- ③ 使用 Illumina 公司的 HiSeq 1000 进行测序。  
\* 由于文库的 4 个样品可以通过 Index 标签序列识别，所以只需使用 1 个通道测序。

##### 【MultiNA 试剂 / 试剂盒】

- 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

\*1：弥散（smear）分析软件需要使用 ver. 1.12 以上的 MultiNA 软件。

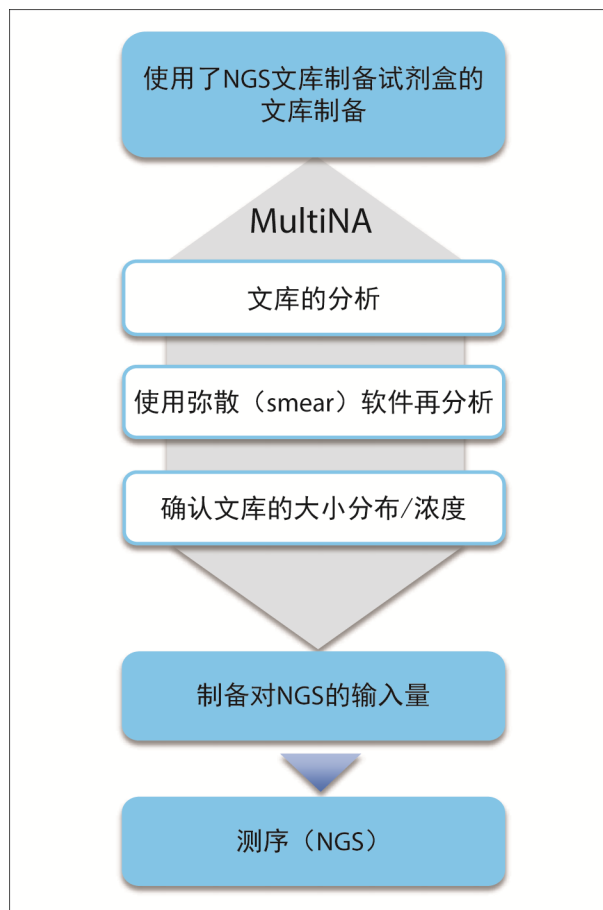


图 1 NGS 文库的质量控制步骤  
NGS Library Quality Control Procedure

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 2、3)。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。

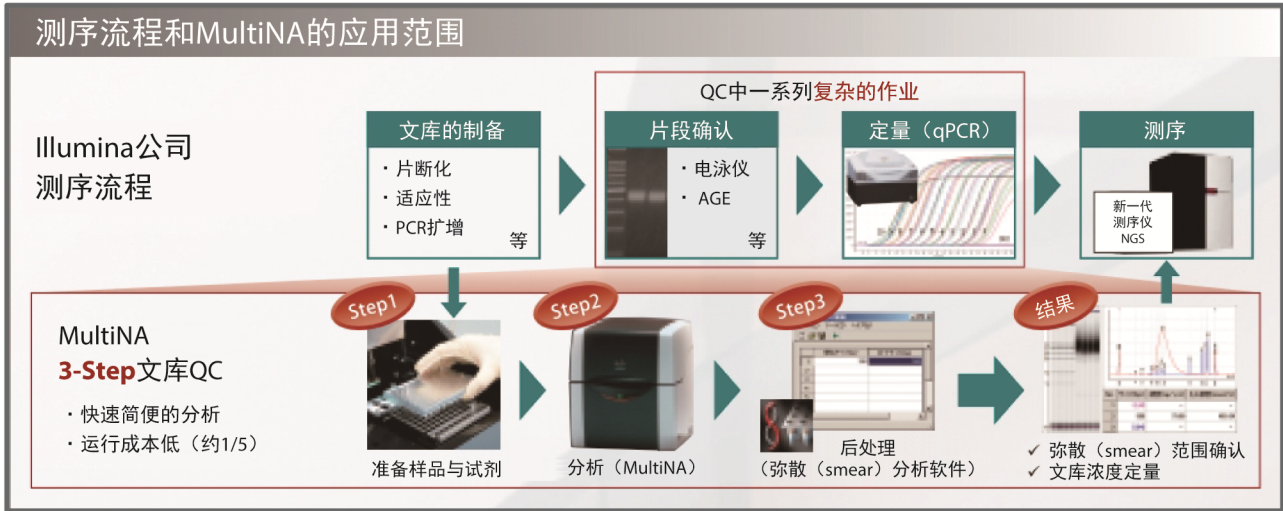


图 2 NGS 流程和 MultiNA 文库质量控制的应用范围  
NGS Process Flow and Range of MultiNA Applications in Library QC

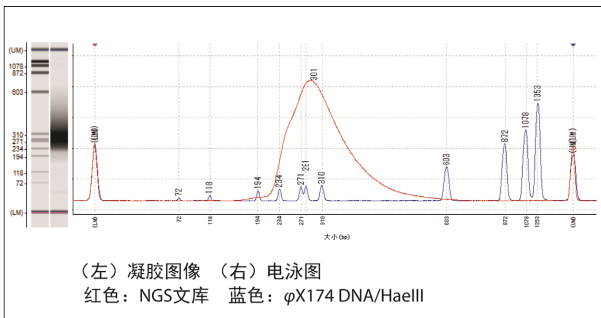


图 3 NGS 文库的电泳示例  
Example of NGS Library Migration

表 1 MultiNA 和实时 PCR 的浓度定量结果\*2  
Concentration Quantitation Results for MultiNA and Real-Time PCR

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\*2  
NGS Results for Four Libraries Using MultiNA for QC

簇密度	548 K / mm <sup>2</sup>	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 %)		

\*2: 由小原收先生提供了样品和数据。

注 1) 本应用报告仅作为分析示例的介绍,属于公司产品设计外的操作,分析结果也仅供参考。

注 2) 文库制备时如果没有进行 PCR,可能无法根据文库的分布数据得到理想的检测灵敏度。