

# 了解用于下一代测序的文库定量检测

## 简介

下一代测序 (NGS) 已成为从基因分型到全基因组测序的重要方法。如果用户要进行一项NGS实验, 则必须先将纯化的核酸样本制备成测序文库。适用于Illumina™ NGS系统的文库制备涉及将核酸样本与两个寡聚核苷酸 (称为P5和P7 adaptor) 结合在一起, 使其可以与flow cell结合。

随着NGS仪器测序能力的不断提高, 研究人员能够在单次测序中检测更多的样本或样本库, 大大降低了每个样本的测序成本。然而, 由于起始核酸样本质量不同以及所使用的靶标富集方法的不同, NGS文库浓度的差异也极大。为了确保将每个合并的文库测序至所需的深度, NGS文库必须精确量化和归一化, 以便每个样本都能达到所需的测序reads量。

常用的文库定量方法包括荧光光谱法和定量PCR (qPCR) 方法。虽然两种方法都提供了相对准确的水库浓度测量, 但这两种技术仍然存在特定的考虑因素。在本文中, 我们比较了两种文库定量技术: Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit和Invitrogen™ Collibri™文库定量试剂盒, 分别使用Invitrogen™ Qubit™荧光计和qPCR (表1)。同时我们对Collibri文库定量试剂盒和Roche KAPA™文库定量试剂盒进行了比较。

表1. Qubit和Collibri文库定量检测的比较。

	Qubit检测	Collibri检测
特异性	荧光团优先结合dsDNA	仅测量含有P5和P7 adaptor的水库片段
准确度	15%以内	10%以内
起始样本量要求	1-20µL稀释样本	4µL稀释样本
动手操作时间	设置时间5分钟; 每个样本测量时间3秒	设置时间30分钟 (96孔板)
处理20个样本的用时	8分钟	90分钟
处理80个样本的用时	25分钟	90分钟

Qubit dsDNA HS Assay是一种荧光检测, 其使用dsDNA结合染料, 可以准确测定NGS文库浓度, 且每个样本只需几分钟的简单操作流程。虽然Qubit dsDNA HS Assay具有良好的准确度和灵敏度, 但该系统目前设计为一次只读取一个样本, 因此当样本增加到20-30个以上时, 此种检测方法便不再适合。

Collibri文库定量试剂盒是一种基于qPCR的分析检测，通过扩增P5和P7 Adaptor序列，可特异性扩增和定量Illumina测序文库。Collibri文库定量试剂盒具有6点标准曲线，可对各种文库浓度范围进行准确和灵敏的定量分析。

## 方法概述

### Qubit dsDNA HS Assay

Qubit dsDNA HS Assay使用靶标特异性染料，该染料与dsDNA结合时会发出荧光。与可能会因为样本中的污染物而高估样本浓度的紫外光谱法不同，使用Qubit dsDNA HS Assay的Qubit荧光计不会测量可能存在的盐、核苷酸或RNA。Qubit检测也比紫外光谱法灵敏得多，因为它能够以更低的背景测量稀释的DNA样本。

Qubit dsDNA HS Assay使用两个参考标准品来生成标准曲线，利用这一曲线并根据经验检测样本的浓度。Qubit dsDNA HS Assay可用于测量DNA浓度在10pg/μL至100ng/μL之间的样本。超过此浓度范围的样本必须经过稀释然后进行重新测试，以确保它们的结果落在参考标准的线性范围内。Qubit dsDNA HS Assay具有高度的准确性，在0.5-200ng/μL的浓度范围内的变异系数(CV) <5%。

Qubit dsDNA HS Assay的操作流程快速简便。其检测方案采用简单的“即混即测”方式，孵育时间仅需几分钟。简言之，将1-20μL样本(或1-10μL参考标准品)加入Qubit工作溶液中。孵育2分钟后读取样本并计算样本中的DNA浓度。

### Qubit检测的考虑因素

使用Qubit系统进行文库定量有许多好处。其检测流程快速有效，可以轻松地同时分析数十个样本。内置的分析软件简化了数据计算，会在检测结束后立即呈现文库浓度。样本起始量可灵活调整并且孵育时间短，使得可以快速重新测试最初可能超出标准曲线范围的样本。

## Collibri文库定量试剂盒

Collibri文库定量试剂盒是一种基于qPCR技术的检测，包含准确定量Illumina测序文库所需的所有试剂。该试剂盒包含基于Invitrogen™ SYBR™ Green染料的Collibri文库定量预混液、Collibri DNA标准品和Collibri文库稀释缓冲液。

使用Collibri文库定量试剂盒进行文库定量时，使用一组6个预先稀释的DNA参考标准品来生成标准曲线，通过这一标准曲线，可以根据经验测定样本文库浓度。基于Invitrogen™ Platinum™ II Taq 热启动DNA聚合酶的qPCR预混液含有靶向Illumina P5和P7 Adaptor序列的引物。Platinum II Taq 热启动DNA聚合酶可以均匀扩增GC含量不同和长短各异的DNA片段，因此是定量所有测序文库的理想选择。

在96孔光学PCR板中进行检测设置，将预混液和4μL稀释的文库(或标准品)加入每个孔中，然后在qPCR仪器上运行。由于Invitrogen™ ROX™参考染料使用通用浓度，所以Collibri文库定量试剂盒与所有qPCR平台兼容。运行完成后，标出每个DNA标准品的平均Ct值，然后在任何数据可视化软件中生成标准曲线。最后使用标准曲线进行绝对定量计算出稀释文库的浓度。

### Collibri检测需要考虑的因素

与荧光测定方法相比，qPCR检测能够更加特异和准确地检测经适当处理、可扩增的测序文库，这些文库可在测序时形成簇。

Colibri检测非常灵敏——可定量飞摩尔量级的片段文库。起始量要求非常低，通常仅需4μL稀释的文库样本，浓度>0.0002 pM即可。对含P5和P7 adaptor序列的文库片段进行特异性扩增成为所有Illumina文库类型的通用检测方法。

### Qubit、Colibri和KAPA定量检测的实验比较

为了评估Qubit、Colibri和KAPA定量检测的性能，使用多种市售的文库制备试剂盒制备不同RNA起始量的Illumina测序文库。

准备好RNA测序文库后，使用Colibri或Qubit检测文库浓度，并比较所有样本的浓度。使用100ng至1μg的起始RNA，按照制造商提供的使用说明，使用市售的rRNA去除和文库制备试剂盒进行文库制备。通过上述制备方法产生328-412bp的文库片段，之后使用Colibri和Qubit进行定量检测。总体来讲，两种文库定量试剂盒的定量结果存在高度的一致性（图1）。使用Colibri和KAPA基于qPCR的文库定量检测的结果也高度相关（图2）。

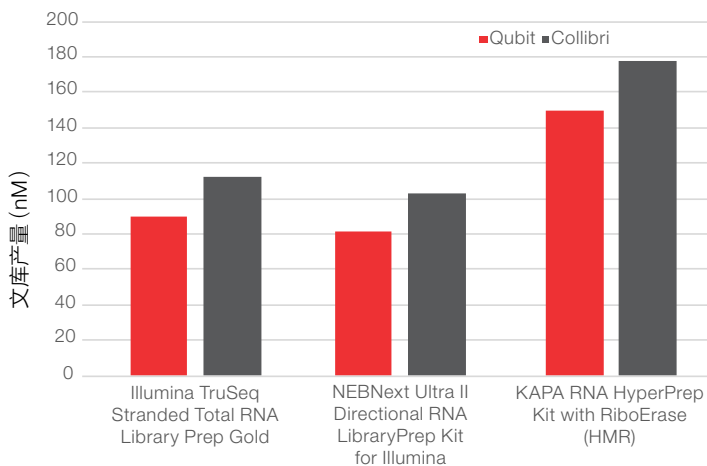


图1. 来自对照RNA样本的文库产量检测结果。根据制造商的说明，从100ng Invitrogen™通用人类参考RNA (UHRR) 中制备RNA测序文库。使用Colibri或Qubit定量检测文库浓度，并比较所有样本的浓度。

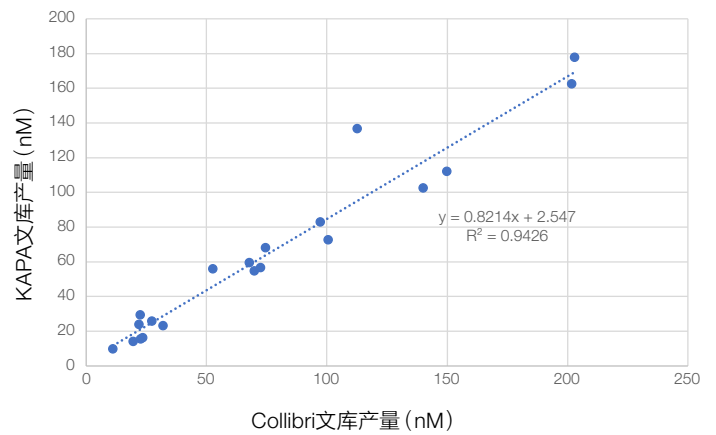


图2. Colibri和KAPA定量试剂盒表现出高水平的相关性。根据制造商提供的建议，使用来自一系列样本类型的100ng-1μg起始RNA构建RNA NGS文库。所有文库均使用Colibri文库定量试剂盒和KAPA文库定量试剂盒进行定量检测。

### 结论

文库定量是NGS实验流程中的关键步骤，有助于确保每个样本测序均达到所需的深度。我们已经证明Colibri文库定量试剂盒和Qubit HS dsDNA检测试剂盒可用于精确地检测20至180 nM的文库浓度。

当文库浓度被高估时，导致的成簇不足可能导致数据输出量减少，但过度成簇也可能导致质量分数降低以及下游分析问题。Colibri文库定量试剂盒和Qubit dsDNA HS检测试剂盒均可在Illumina NGS系统的RNA测序流程中实现理想的成簇。

鉴于已证明这些方法之间的结果相当，使用者在选择文库定量检测时还应该注意一些关键的实验流程注意事项。基于qPCR的Colibri检测的精确度更高，是测量珍贵样本的理想方法。Qubit检测的精确度略低，但快速的检测流程和包含的定量软件使其成为文库常规定量的理想选择。无论选择何种检测方法，使用者都应掌握良好的实验技术以确保可精确测量文库浓度和获得高质量的Illumina测序数据。

## 订购信息

产品	数量	货号
<b>RNA测序</b>		
Collibri链式RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台)*	24次制备	A38994024
	96次制备	A38994096
Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台, 包含H/M/R rRNA去除试剂盒)*	24次制备	A39003024
	96次制备	A39003096
ERCC RNA Spike-In Mix	1个试剂盒	4456740
ERCC ExFold RNA Spike-In Mix	1个试剂盒	4456739
<b>文库定量</b>		
Collibri文库定量试剂盒*	100次反应	A38524100
	500次反应	A38524500
Qubit 4 荧光计	1台仪器	Q33226
Qubit 1X dsDNA HS检测试剂盒	100次检测	Q33230
Qubit 4 NGS Starter Kit	1盒	Q33228
<b>文库扩增</b>		
Platinum SuperFi文库扩增预混液	50次反应	A38539050
	250次反应	A38539250
Platinum SuperFi文库扩增预混液, 包含引物混合物*	50次反应	A38540050
	250次反应	A38540250
<b>Applied Biosystems™ 配套仪器和耗材</b>		
Veriti 96孔热循环仪	1台仪器	4375786
ProFlex 96孔PCR系统	1台仪器	4484075
MicroAmp EnduraPlate光学96孔透明反应板, 带条形码	20块板	4483354
MicroAmp光学96孔反应板	10块板	N8010560
MicroAmp透明粘性封板膜	100张	4306311
MicroAmp 8联管, 带圆顶管盖, 0.2mL	125条	A30589

H=人, M=小鼠, R=大鼠。

\*并非所有国家均提供所有试剂盒。

Find out more at [thermofisher.com/collibri](http://thermofisher.com/collibri)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: [cnbidmarketing@thermofisher.com](mailto:cnbidmarketing@thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC