

人类基因组 DNA 文库定量及质检试剂盒

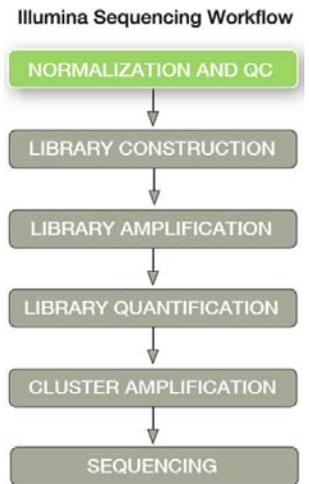


- 1) 定量低浓度的样本 DNA;
- 2) 质检来源复杂的样本 DNA, 如 FFPE;
- 3) 预测文库构建的成功概率、扩增产量和片段大小。

二代测序中样本 DNA 的质量和数量对文库构建的结果具有非常大的影响。KAPA 人类基因组 DNA 文库定量及质检试剂盒主要用来解决二代测序文库文库构建前模板 DNA 定量和质检的。

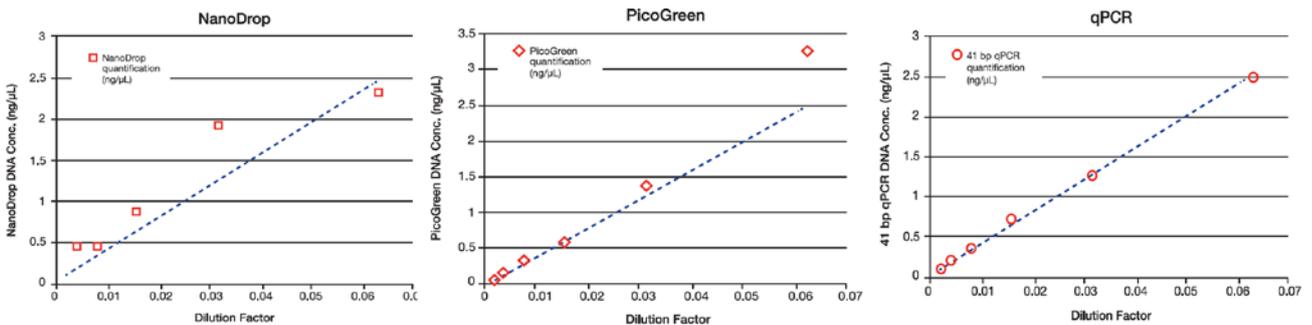
1、样本涵盖

- 1) 福尔马林固定组织样本 (FFPE), 其 DNA 损坏程度较重;
- 2) 激光显微切割捕获的样本;
- 3) 提取自流式细胞的 DNA;
- 4) 血浆或血清中的游离 DNA;
- 5) 其他微量或非常珍贵的临床样本。



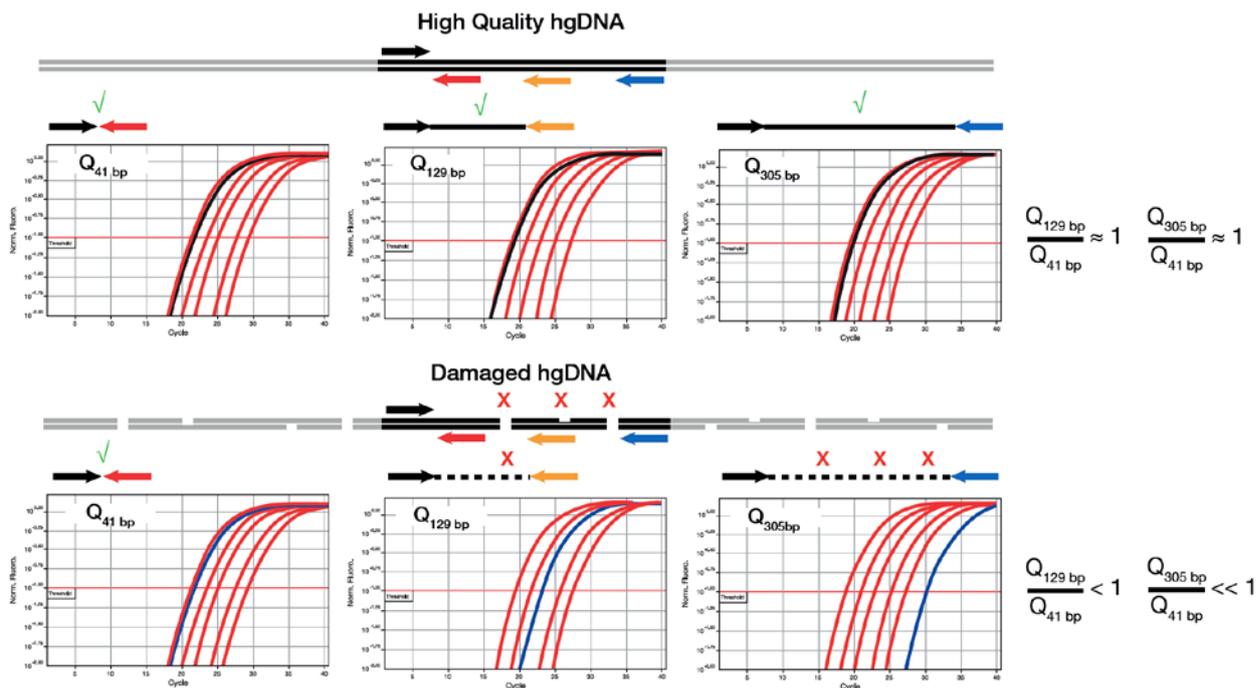
2、准确定量低浓度 DNA: qPCR 法定量低浓度 DNA, 结果更准

目前二代测序文库构建时, 常规主要采用分光光度计和电泳法进行定量 (例如 NanoDrop, PicoGreen 或 Bioanalyzer), 而其结果往往与真实结果存在较大的出入, 主要缺点体现在: 1) 样本稀释后定量不准; 2) 无法区分总 DNA 中的有效 DNA 片段; 3) 对污染物敏感, 导致测定的有效目的 DNA 浓度过高或过低。



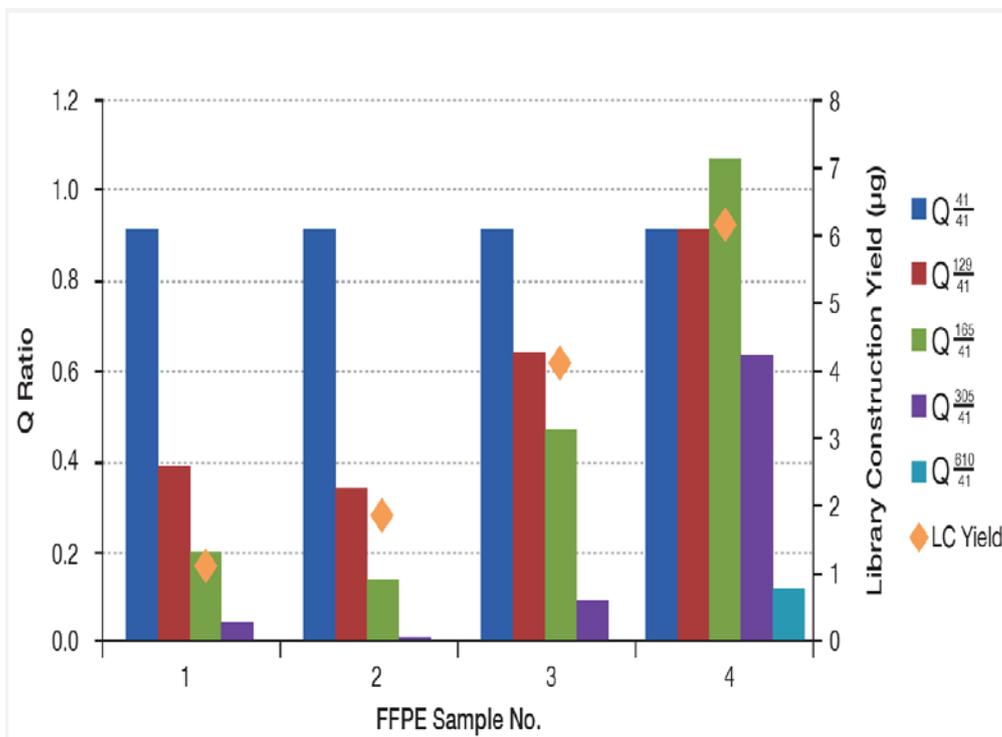
上图所示, 6 个 2 倍浓度梯度稀释的 DNA 样品, 从 2.5ng/μL 到 0.09ng/μL, 分别用 NanoDrop, PicoGreen、qPCR 法进行定量。结果显示 qPCR 法的结果更准, 均匀性更好。

3、利用 Q-比值来评价模板 DNA 的质量



如上图所示: 相同的标准品设置, 产生三种标准曲线, 扩增高度保守的人类单拷贝数基因, 片段长度分别为 41bp、129bp、305bp。其中 41bp 的片段被用来对样本进行绝对定量。而 129bp、305bp 片段来判断 DNA 的质量。DNA 质量不高会严重影响较长片段的扩增效率, 因此可通过 Q-129、Q-305 与 Q-41 的比值, 来推断样本 DNA 的质量。通过“Q-比值”, 可以推测模板 DNA 的质量并预测文库构建和测序的成功概率。

4、通过 Q-比值来预测 FFPE 来源样本文库构建的成功概率

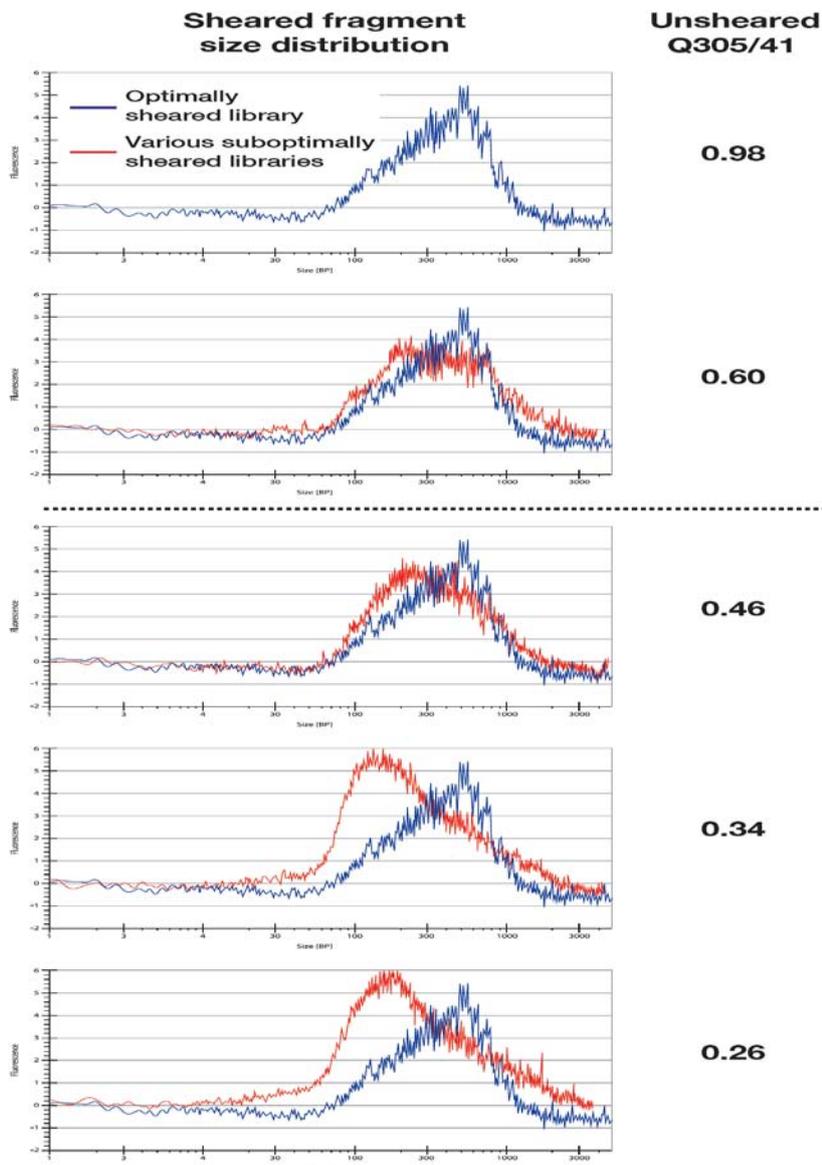


左图: FFPE 样本来源 DNA 的 Q-比值与文库构建后产量的关系。样本 DNA 质量差, 直接降低文库扩增的效率, 尤其是片段长度稍长的情况下。一般情况下, 用较短片段的 Q-比值 (Q-41) 来进行定量, 用较长片段的 Q-比值 (Q-129、Q-305) 来判断文库 DNA 的质量。左图通过 Q-比值来推断 5 个人类 FFPE 来源 DNA 样本的质量。这些样本的 Q-比值与文库构建 (Library Construcion, LC) 的质量有非常大的直接关系。(数据来源: Mirna Jarosz 和 Frank Juhn, Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA)。

5、通过 Q-比值来推测片段大小和测序的质量

从人类全基因组测序结果中挑选 10 个人类基因组样本, 其尺寸的实际片段大小 (~bp) 与预测值相比偏小。

所有的样本都是通过标准的文库构建流程进行全基因组测序, 模板 DNA 的起始量为 100ng。采用 Sage Science Pippin Prep 选择片段, 割胶选择 500bp 左右。



左图：Q305/Q41 的比值由上至下逐渐降低，主要说明：

1) 样本 DNA 打断后，尺寸大小由上至下逐渐降低；2) 测序的文库片段中，小片段的量增多。

即使严格地选择片段尺寸，仍然会有会有很多小片段，这一点通过 Q-比值也可以看出，小片段的存在会影响文库质量。

(数据来源：Kathleen Steinmann, Sharon Kim 和 Maura Costello, Broad Institute, MA, USA)

6、产品信息

货号	产品	规格	价格/元
KK4960	hgDNA 定量和质控试剂盒（通用型）	3×100 反应	8000
KK4961	hgDNA 定量和质控试剂盒（ABI Prism 专用）	3×100 反应	8000
KK4962	hgDNA 定量和质控试剂盒（Bio-Rad iCycler 专用）	3×100 反应	8000
KK4963	hgDNA 定量和质控试剂盒（LightCycler 480 专用）	3×100 反应	8000

注：试剂盒内的 DNA 标准品和引物可单独购买。