使用 Twist Bioscience Enzymatic Fragmentation Kit 2.0 和Universal Adapters System 在 Opentrons Flex 上自动化制备 NGS 文库

作者：
D'Andra Howell,1 Paul Frere,2 James Flynn,2 Frances Slater, PhD,1 和 Kinnari Watson, PhD1
1 Opentrons Labworks, Inc., 2 Twist Bioscience

摘要

下一代测序（NGS）文库的制备是一个复杂而精细的过程，涵盖 DNA 片段化、末端修复、接头添加以及 PCR 扩增等多个关键步骤。这一系列步骤中还穿插着多个纯化环节，要求用户在各个孵育阶段之间频繁进行操作，这无疑增加了实验的繁琐度和时间成本。

为了简化这一流程，提升实验效率，我们在本研究中介绍了一种在 Opentrons Flex 平台上实现的自动化协议。该协议使用 Twist Library Preparation Enzymatic Fragmentation (EF) Kit 2.0 和 Twist Universal Adapters System 制备可用于测序的文库。通过在一个协议中实现整个流程的自动化，用户可以在实验期间腾出时间处理其他任务。

引言

在下一代测序（NGS）技术的广阔应用中，文库制备占据着举足轻重的地位，而片段化作为这一流程的关键步骤，更是不可或缺。由于 NGS 平台对 DNA 分子的长度有着严格的要求，通常需要将完整的 DNA 打断为长度介于 145 至 425 个碱基之间的片段，以便构建出符合要求的测序文库。DNA 的片段化方法包括以下两种：

(a) 机械方法：例如超声或声波剪切。
(b) 酶促方法：例如使用限制酶、转座酶或其他酶。
相比于机械方法，酶促片段化对 DNA 的损伤较小、更易扩展且不需要特殊仪器。因此，酶促片段化非常适合自动化操作，并且能够把接头连接和文库扩增结合在单个自动化协议中完成。通过将文库制备的不同步骤整合到一起，自动化能够显著节省科学家在实验中的手动操作时间。

主要特点

- 自动化酶促片段化和文库制备：借助 Opentrons Flex 平台的卓越性能，本方案能够高效地完成 DNA 的酶促片段化及文库制备工作。可根据需要灵活控制 DNA 片段长度，且展现出极佳的均一性，为后续的测序工作奠定了坚实的基础。

- 整合多个 NGS 文库制备环节：本方案通过精心设计，巧妙地融合了多个 NGS 文库制备的核心步骤成单个自动化工作流程。用户仅需进行简单的设置，即可在整个实验过程中享受到无人值守的便捷体验，极大地提升了实验的流畅度和效率。

在本应用说明中，我们将详细介绍如何利用 Twist Library Preparation Enzymatic Fragmentation (EF) Kit 2.0 和 Twist Universal Adapters System，在 Opentrons Flex 这一先进的自动化平台上，实现酶促片段化、接头连接以及 PCR 扩增的全程自动化操作。

OCTOBER 2024 © OPENTRONS 2024, ALL RIGHTS RESERVED.

方法

样品

我们使用 50 ng 的 Promega 人类男性基因组 DNA（产品编号：G1471）作为酶促片段化的起始输入。

酶促片段化和文库制备

我们使用 Twist Library Preparation Enzymatic Fragmentation (EF) Kit 2.0，96 个样品（产品编号：104207）对 DNA 进行片段化，并使用 Twist Universal Adapters System 中的 TruSeq Compatible，96 样品板 A（产品编号：101308）将接头添加到片段化后的 DNA 上，然后通过 UDI 引物进行扩增。该流程在 Opentrons Flex NGS 工作站（产品编号：991-00179）上实现自动化操作，使用了 Opentrons 在线协议库中的 Twist Bioscience Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentationand Twist Universal Adapters System 协议（DOC-001239 REV 6.0; https://library.opentrons.com/p/Twist-EF-2_0）。

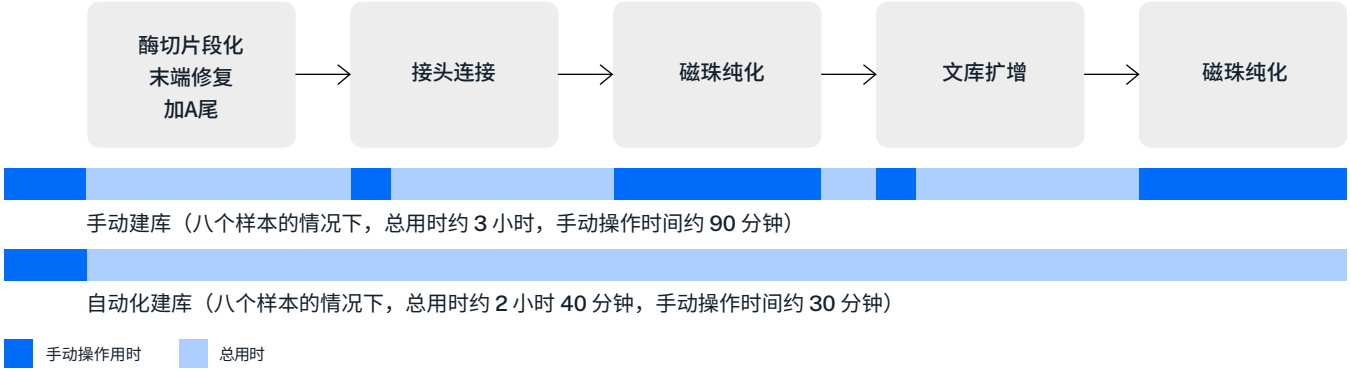


图 1：全自动化 Twist BioScience Library Preparation EF 2.0 工作流程减少了约 67% 的手动操作时间（样本数量为 8 个）

表1．用于自动化的协议参数

参数	输入类型	默认	最小值	最大值	描述
空运行	Bool	False			空运行会跳过热循环仪的孵育步骤
装备热循环仪	Bool	True			是否会使用 Opentrons 的热循环仪
样本数	Integer	8	1	24	样本数
PCR 循环数	Integer	7	3	12	扩增循环数
片段化温度	Integer	37	30	37	片段化温度（摄氏度）
片段化时间	Integer	20	5	40	理想的片段化时间（分钟）
接头体积	Integer	5	1	5	加入的接头的体积（ul）
UDI 引物板的起始列	Integer	1	1	12	在 UDI 引物板上，选择从哪一列开始添加引物(常用于部分使用过的板)

*默认参数基于标准版 Twist 协议；如需调整，请联系 Twist 技术支持

DNA 文库分析

文库制备完成后，使用 Agilent 4150 TapeStation 和 High Sensitivity D1000 Reagents（产品编号：5067-5585）以及 High Sensitivity D1000 ScreenTape（产品编号：5067-5584）分析 DNA 文库。使用 Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit (产品编号：Q33231）和 Qubit™ 4 荧光计对 DNA 进行定量分析。

结果

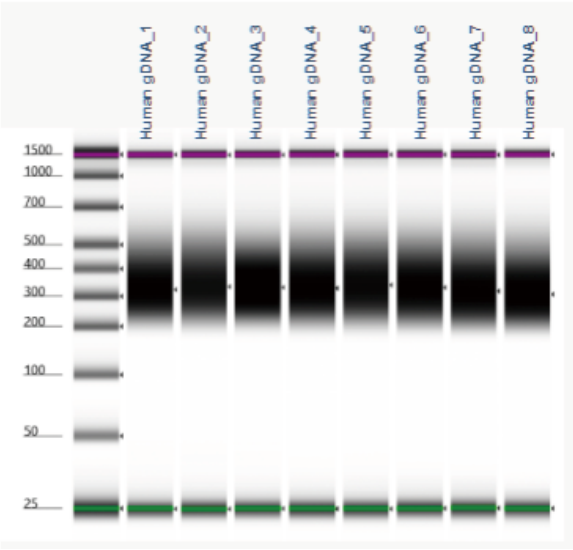
样品

在使用 Twist Bioscience Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapters System 协议（DOC-001239 REV 6.0; https://library.open-trons.com/p/Twist-EF-2_0）后，我们在仪器上完成了 8 个样品的 DNA 片段化和文库制备，耗时 2 小时 40 分钟。在自动化流程开始前，我们仅需要大约30分钟的手动操作来完成桌面布局、试剂及样品的准备工作。

当我们扩大到 16 个样本和 24 个样本时，仪器上的自动文库制备时间分别增加到 3 小时和 3 小时 30 分钟。这一时间增长是合理的，因为随着样品数量的增加，自动化平台需要处理更多的步骤和数据，从而导致了时间的延长。但即便如此，相较于手动操作，自动化流程仍然展现出了更高的效率和准确性。

在实际操作中，我们发现实际用时可能会因为酶切时间和PCR 轮数的不同而有所变化。因此，用户可以根据自己的具体需求和实验条件，灵活地调整协议的参数，以达到最佳的实验效果。

在完成文库制备后，我们对 8 个样品运行结果的产量和片段大小进行了可视化与定量分析。凝胶图像清晰地显示，片段主要集中在 300-500 bp 的范围内，这与我们预期的片段大小相符。同时，通过定量检测，我们得出最终文库的平均浓度为 71.6 ng/μL，平均片段大小为 328.1 bp。这些数据表明，我们的自动化文库制备流程不仅高效，而且能够生成一致性强的测序文库。



	产出 (ng/μL)	长度 (bp)
平均	71.6	328.1
CV（%）	13.3	3.36

图 2. 高产出以及长度均一的人类基因组 DNA 文库
数据为 8 个 Promega 人类男性基因组 DNA 样本，投入量为 50ng。

讨论

在生命科学研究的快速发展中，下一代测序（NGS）技术已成为解析复杂生物问题的重要工具。然而，传统的 NGS 文库制备过程繁琐且耗时，极大地限制了其在大规模样本分析中的应用。为了克服这一挑战，我们采用了 Opentrons Flex 自动化平台与 Twist Library Preparation Enzymatic Fragmentation Kit 2.0（Twist EF 2.0）及 Universal Adapters System 的结合，实现了 DNA 片段化和文库制备的自动化操作。

在自动化流程中，科学家仅需花费 30 分钟进行桌面设置和试剂准备，随后整个流程便可在 Opentrons Flex 平台上自动运行，无需额外的人工干预。这一显著的自动化程度不仅极大地提高了实验效率，还减少了人为操作带来的误差，从而提升了实验结果的准确性和可靠性。

此外，该自动化流程在处理 8-24 个样本时，从准备到流程完成的运行时间仅为 3-3.5 小时。这一高效的运行时间使得科学家能够在短时间内处理大量样本，为大规模测序项目的快速推进提供了有力支持。

与手动方法相比，自动化流程展现出了明显的优势。传统的手动方法要求用户在多个时间点返回操作，如设置片段化、连接反应和 PCR 扩增等，这不仅增加了实验步骤的复杂性，还可能导致实验结果的不一致性。而自动化流程则通过整合 DNA 片段化和文库制备的各个步骤，实现了流程的连续性和稳定性，从而生成了更加一致且高产的文库。

综上所述，Opentrons Flex 与 Twist EF 2.0 文库制备工作流程的结合为 NGS 文库制备带来了革命性的变革。这一创新技术不仅提高了实验效率和准确性，还为生命科学研究的深入发展提供了强有力的技术支持。未来，随着自动化技术的不断发展和完善，我们有理由相信，NGS 文库制备的自动化程度将进一步提升，为生命科学领域带来更多惊喜和突破。

www.opentrons.com.cn

0755-26417273 18098952246 Marketing.china@opentrons.com

OCTOBER 2024 © OPENTRONS 2024, ALL RIGHTS RESERVED.