

在 Opentrons Flex® NGS 工作站 上实现 QIAseq® miRNA 文库试剂 盒的自动化操作



作者

Matthew Akana¹, Jonathan Shaffer², Ioanna Andreou², Kinnari Watson 博士¹

¹ Opentrons 公司; ² QIAGEN 公司

摘要

为新一代测序 (NGS) 制备微小RNA (miRNA) 文库涉及多个酶学处理和片段筛选步骤。将复杂的NGS文库构建步骤自动化可提高标准化程度,并最大限度地减少与手动文库构建相关的潜在错误。本文展示的性能数据表明,在 Opentrons Flex® NGS 工作站上自动化运行 QIAseq® miRNA 文库试剂盒,能够产生高度可重复的文库,同时显著减少手动操作时间,并消除了因多名操作者手动操作可能带来的批次效应。

关键特性:

- **自动化性能匹配:** 在 Opentrons Flex 工作站上自动化运行 QIAGEN 的 QIAseq miRNA 文库试剂盒,可产生与手动制备相媲美的高质量 miRNA 文库。
- **操作效率提升:** 自动化将人工操作点从六处减少至一处,并节省约 2 小时的手动操作时间。
- **文库质控优化:** 使用 QIAseq Normalizer Kit 进行自动化文库均一化,相较于基于 qPCR 的均一化方法,可将文库质控时间额外缩短 1 至 2 小时,手动操作时间减少 1 小时 20 分钟。

引言

微小RNA (miRNA) 是平均长度约 22 个核苷酸的小型非编码RNA。它们通过与靶标 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTRs) 相互作用来抑制基因表达,从而调控基因表达。miRNA 的异常表达与发育、细胞分化、信号转导等过程的变化相关。研究表明,miRNA 可充当致癌基因和抑癌基因,而来自血清、血浆和尿液的 miRNA 已被作为多种生理或病理过程的生物标志物。

诸如 Northern 印迹、RT-PCR 和微阵列等方法曾被用于研究 miRNA。近年来,新一代测序 (NGS) 技术因其单碱基分辨率、定量检测读长的能力以及高通量数据输出等优势而日益普及。因此,NGS 已被证明是进行 miRNA 组谱 (miRnome) 分析的首选方法。

为此,QIAGEN 开发了 QIAseq miRNA 文库试剂盒,用于从经 miRNeasy 系列试剂盒分离的总 RNA 中制备文库。首先,接头通过3'羟基和5'磷酸基团连接到成熟的 miRNA 分子上。其次,在逆转录过程中整合了独特的分子标签 (Unique Molecular Indices, UMIs),该标签可用于去除 PCR 重复以及 PCR 和测序错误。接下来,通过合成第二链 cDNA 并添加 index 接头完成文库构建。该工作流程包含多个优化的片段筛选步骤,有助于富集大小在16-40个碱基之间的 RNA,并包含一种限制 Y4 RNA(一种常见的小 RNA 种类)掺入的方法。该文库试剂盒提供多种索引选择方案,可在单次测序运行中合并多达768个样本。手动建库耗时6.5小时,文库定量、质量控制和混合还需额外2至4小时。

为使此 miRNA 文库制备工作流程更加高效,我们已在 Opentrons Flex 自动化移液工作站上实现了其全自动化运行,旨在减少人工操作时间和人为错误。本文将描述在 Opentrons Flex 自动化移液工作站上使用 16 个样本进行的自动化工作流程。

方法

样本: 使用 100 ng Human XpressRef Universal Total RNA (QIAGEN, 货号 338112) 制备 miRNA 测序文库。

miRNA 测序文库制备： 分别通过手动方法和 Opentrons Flex 自动化方法，使用 QIAGEN QIAseq miRNA 文库试剂盒（QIAGEN，货号 331505）制备 miRNA 测序文库。手动文库制备严格遵循制造商提供的操作流程。Opentrons Flex 自动化操作采用端到端的 1 天工作流程 (<https://library.opentrons.com/p/QIAseq-miRNA-48x>)，可处理 8 至 48 个样本（图 1）。

文库均一化： 采用 QIAGEN QIAseq Normalizer Kit（QIAGEN，货号 180615），工作流程 A (<https://library.opentrons.com/p/QIAseq-Normalizer-Workflow-A-48x>)（图 2），将文库均一化至 4 nM。

质量控制： 使用 Agilent TapeStation® High Sensitivity D1000 Screentape 检测 miRNA 文库质量及片段大小分布。

测序： 文库在 Illumina MiSeq® 测序仪上进行双端读长 75 bp（2x75）测序。

数据分析： 使用 QIAGEN GeneGlobe miRNA 分析流程 (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>) 对 FASTQ 文件进行分析。

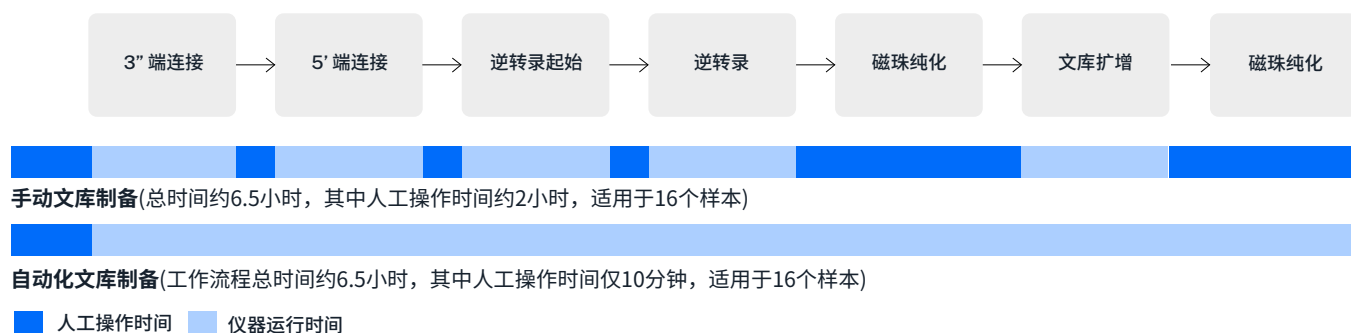


图1：在Opentrons Flex上实现QIAGEN QIAseq miRNA文库试剂盒工作流程全自动化，可将人工操作时间减少近2小时
时间估算基于16个样本的吞吐量。深蓝色：人工操作时间；浅蓝色：仪器运行时间。

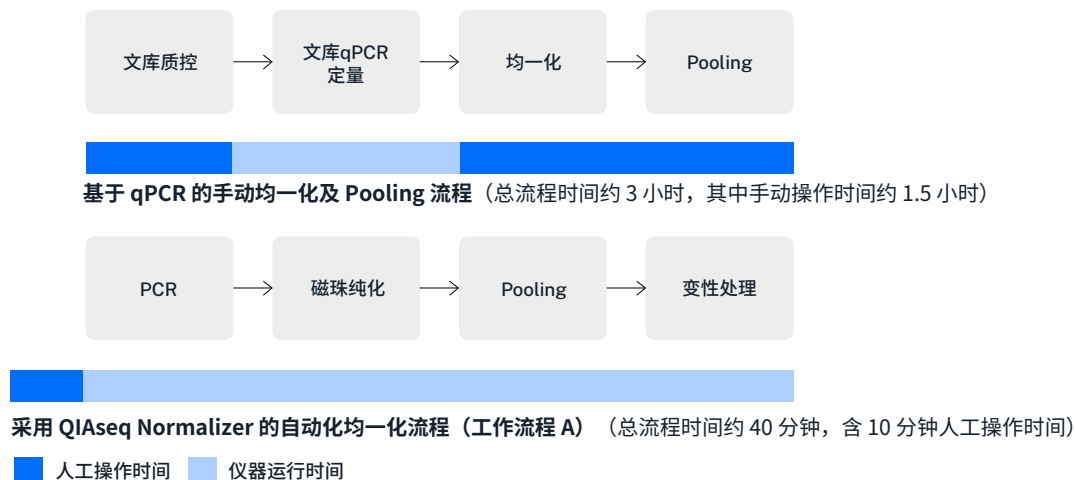


图2. 相较于基于qPCR的均一化方法，使用QIAseq Normalizer实现自动化均一化可使总时间减少约2小时，人工操作时间减少1小时20分钟。
时间估算基于8个样本吞吐量；深蓝色：人工操作时间；浅蓝色：仪器运行时间

结果

在 Opentrons Flex 自动化移液工作站上使用 QIAGEN QIAseq miRNA 文库试剂盒制备的文库，经 TapeStation HS D1000 分析确认文库片段大小及质量（图 3）。样本峰强度位于 ~200 bp，与预期文库大小吻合。

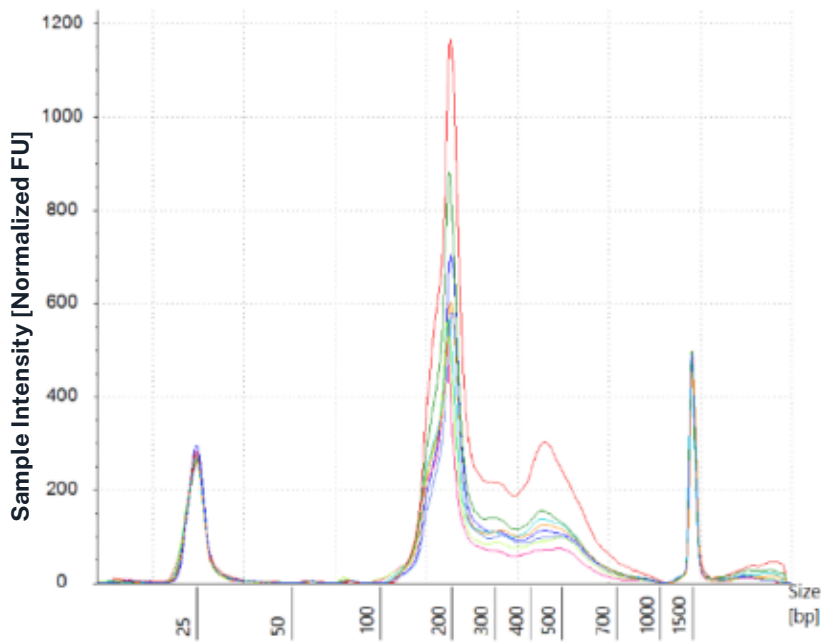


图3. 均一化前 miRNA 文库的片段大小分布。制备的文库呈现约200 bp的预期大小，未见接头二聚体存在证据。

对均一化后的文库进行测序后，我们检测了通过 Flex 自动化移液工作站制备的16个样本的质量控制指标，包括 UMI 读段总数、注释 UMI 读段百分比及 UMI 读段 Q 值（表1）。Flex 制备的样本平均产生约 500 万 UMI 读段，其中 79% 的 UMI 读段可映射至 miRNA 序列数据库 miRBase。UMI 读段的平均 Q 值为 43，表明碱基识别准确率超过 99.99%。分析发现，Flex 制备样本的注释 UMI 读段百分比与 QIAGEN 提供的参考数据及同实验室手动制备结果相当。这些结果表明，自动化流程构建的文库具备高质量测序特性。

表1. 制备的miRNA文库质量控制摘要

样本名称	UMI 读段数	miRBase 注释率(%)	平均 Q 分数, UMI读段
QMR_D6NOV22_S1	7,522,623	78.3	44.2
QMR_G7NOV22_S1	5,293,074	79.7	43.4
QMR_G5NOV22_S1	3,797,234	80.8	42.8
QMR_C6NOV22_S1	4,761,398	80.2	42.8
QMR_G6NOV22_S1	3,377,955	80.4	42.3
QMR_C5NOV22_S1	6,437,633	80.7	44.1
QMR_B6NOV22_S1	2,268,332	81.3	41.9
QMR_H5NOV22_S1	5,201,340	76.8	43.4
QMR_H7NOV22_S1	5,471,410	77.2	43.7
QMR_F6NOV22_S1	5,664,287	80.0	44.4
QMR_B5NOV22_S1	5,484,206	80.9	44.1
QMR_E6NOV22_S1	4,184,891	80.1	42.8
QMR_D5NOV22_S1	6,080,570	79.4	43.5
QMR_E5NOV22_S1	6,453,359	79.3	43.1
QMR_F5NOV22_S1	3,511,117	79.5	39.3
QMR_H6NOV22_S1	6,787,429	76.7	43.9

讨论

本研究展示了在 Opentrons Flex NGS 工作站上实现 QIAseq miRNA 文库试剂盒全自动化制备的方法。自动化构建的文库质量优异，与手动方法性能相当，同时显著减少人工操作时间及操作节点。进一步结合 QIAseq Normalizer 的自动化文库均一化模块，文库制备与均一化的总时长缩短约2小时，节省人工操作时间逾3小时。该方案使得 NGS 技术人员可在8小时工作日内完成文库制备，其中人工操作时间仅需20分钟。最终获得的4 nM 双链 DNA 文库可直接用于混合测序或低温存储。

当前方案虽基于48样本通量设计，但 Opentrons Flex 自动化移液工作站兼容标准96孔板格式，单次运行可自动化处理多达 96 个样本。这种通量提升对生物标志物发现等大样本量研究至关重要。

订购信息

设备、试剂与样本	公司	货号/SKU
Opentrons Flex NGS 工作站 (双8通道移液器配置)	Opentrons	991-00354
QIAseq miRNA Library Kit	QIAGEN	331505
QIAseq Library Normalizer Kit	QIAGEN	180615
Human XpressRef Universal Total RNA	QIAGEN	338112

www.opentrons.com.cn

☎ 0755-26417273

☎ 18098952246

✉ Marketing.china@opentrons.com



TRADEMARKS: OPENTRONS®, OPENTRONS DROP LOGO, OPENTRONS FLEX® (OPENTRONS LABWORKS, INC.) QIASEQ® (QIAGEN GROUP); TAPESTATION® (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.), MISEQ (ILLUMINA, INC.). REGISTERED NAMES, TRADEMARKS USED IN THIS DOCUMENT, EVEN WHEN NOT SPECIFICALLY MARKED AS SUCH, ARE NOT TO BE CONSIDERED UNPROTECTED BY LAW.