



# 高分子量 DNA 片段化：通过移液剪切技术优化 PacBio® 长读长测序

作者

D'Andra Howell,1 Cristian Bravo, PhD,2 Alice Jung,2 Elly Lee,2 and Kinnari Watson, PhD 1  
1 Opentrons Labworks, Inc., 2 Psomagen

## 摘要

DNA 片段化是 PacBio 长读长测序文库制备中的核心环节。在众多 DNA 片段化方法中，移液剪切法以其无需专业设备或试剂盒的简便性脱颖而出。本应用笔记详细阐述了如何利用 Opentrons Flex 液体处理平台实现移液剪切技术的自动化操作，以满足 PacBio 测序对 DNA 片段的特定需求。

相比之下，移液剪切法无需专用设备，且因其涉及数百次混合操作，故极具自动化潜力。

本应用笔记将展示如何利用移液剪切法，将高分子量（HMW）DNA 分解为适合 PacBio 长读长文库制备的片段大小，无论是完整还是降解的 DNA 均可作为起始材料。

## 主要特点

- 自动化移液剪切技术，精准生成符合 PacBio 测序要求的 DNA 片段。
- 该技术适用于完整及降解的 DNA 样本的片段化处理。

## 方法

### 样本制备：

使用 Nanobind HMW DNA 提取试剂盒（PacBio，产品编号：103-260-000）从血液中分离出高分子量 DNA。从 NA12878 细胞系中提取降解的 DNA 作为另一组起始材料。

### DNA 片段化：

采用 Opentrons Flex 液体处理机器人执行移液剪切操作。将 DNA 稀释于 LTE 缓冲液（PacBio，产品编号：103-228-900）中，并置于 Nest 2 mL 深孔板内（Opentrons，产品编号：999-00103）。根据表 1 所示条件进行剪切操作。

（注：表 1 的具体内容在原文中未展示，故在此保留提及，但实际表格数据需参考原文或相关实验数据。）

## 引言

PacBio 长读长 DNA 测序技术相较于短读测序，具备以下显著优势：

减少组装的不确定性。  
简化文库制备流程。  
测序运行时间大幅缩短。

值得注意的是，尽管两种测序方法均需对 DNA 进行片段化处理，但 PacBio 长读长测序要求 DNA 片段更大，通常介于 10 kb 至 25 kb 之间。

目前，机械方法（如超声处理、雾化及流体力学剪切）是生成 PacBio 测序所需片段大小的主流技术，但这些方法往往依赖于专业的 DNA 剪切设备。

表 1. 移液剪切条件

DNA 浓度	10 ng/μL
总体积	300 μL, 500 μL
移液速度	1000 μL/s
移液体积	200 μL
混合次数	800 cycles

## 数据分析:

我们采用 Femto Pulse (Agilent, 产品编号: M5330AA) 仪器, 并配套使用 gDNA 165kb 分析试剂盒 (Agilent, 产品编号: FP-1002-0275), 对剪切前后的 DNA 样本进行了毛细管脉冲场电泳分析。

## 结果与讨论

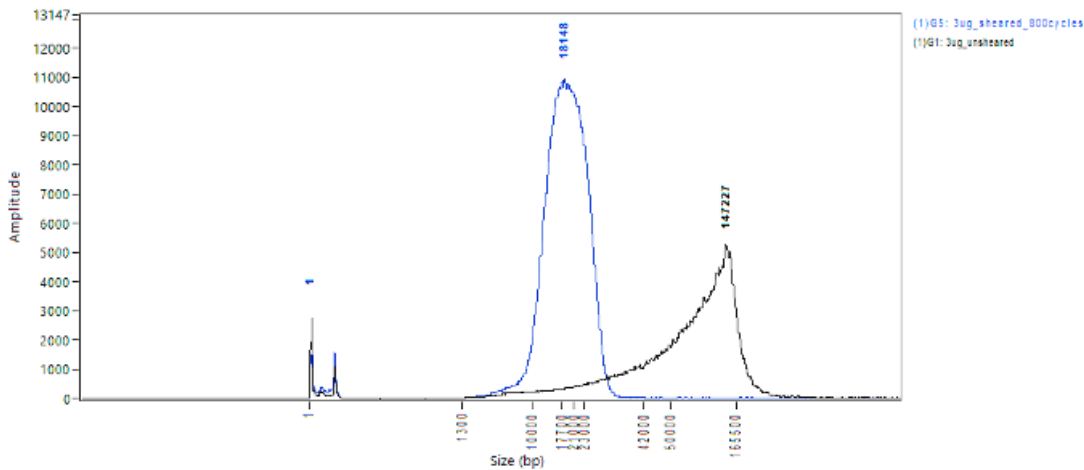
在本次研究中, 我们对 3 $\mu$ g 和 5 $\mu$ g 的高分子量 DNA (HMW DNA) 样本进行了移液剪切处理, 并详细分析了剪切前后 DNA 片段的长度变化。3 $\mu$ g 和 5 $\mu$ g 的 DNA 样本分别在 300 $\mu$ L 和 500 $\mu$ L 的 LTE 缓冲液中稀释。

在评估 DNA 剪切质量的过程中, 我们重点关注基因组质量数值 (GQN), 该指标表明 DNA 的完整性, 以及符合 PacBio 长读长 DNA 片段的特定尺寸和分布要求。这些要求包括:

- 平均片段大小需位于 15-20kb 之间
- 分布范围应在 10-30kb 之间
- 剪切片段的大致范围为 5-40kb

本研究中使用的完整 HMW DNA 样本在 30 kb 阈值下的 GQN 分别为 8 (3 $\mu$ g 样本) 和 8.8 (5 $\mu$ g 样本)。剪切后的 DNA 符合上述所有要求, 表明移液剪切技术可以提供适合 PacBio 测序的 DNA 片段 (图 1)。

(A) 3 $\mu$ g HMW DNA, 剪切前后对比



(B) 5 $\mu$ g HMW DNA, 剪切前后对比

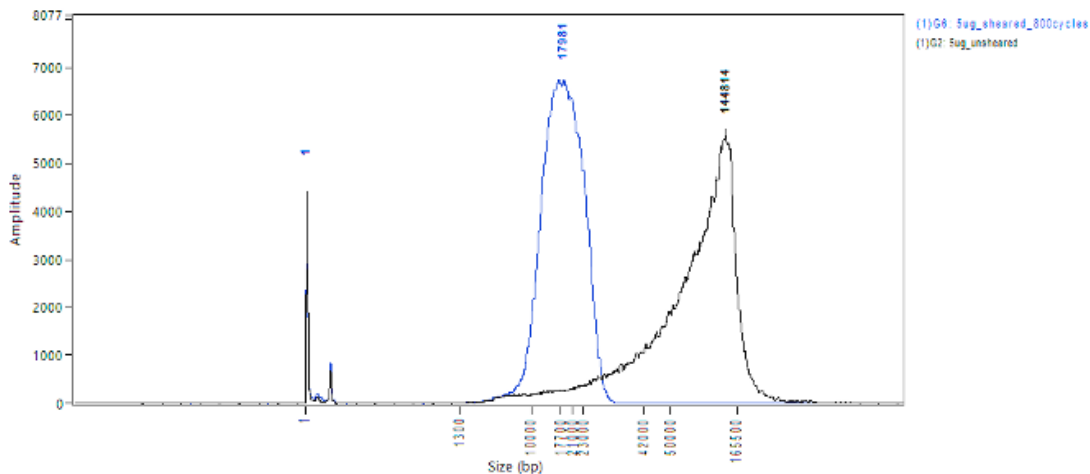


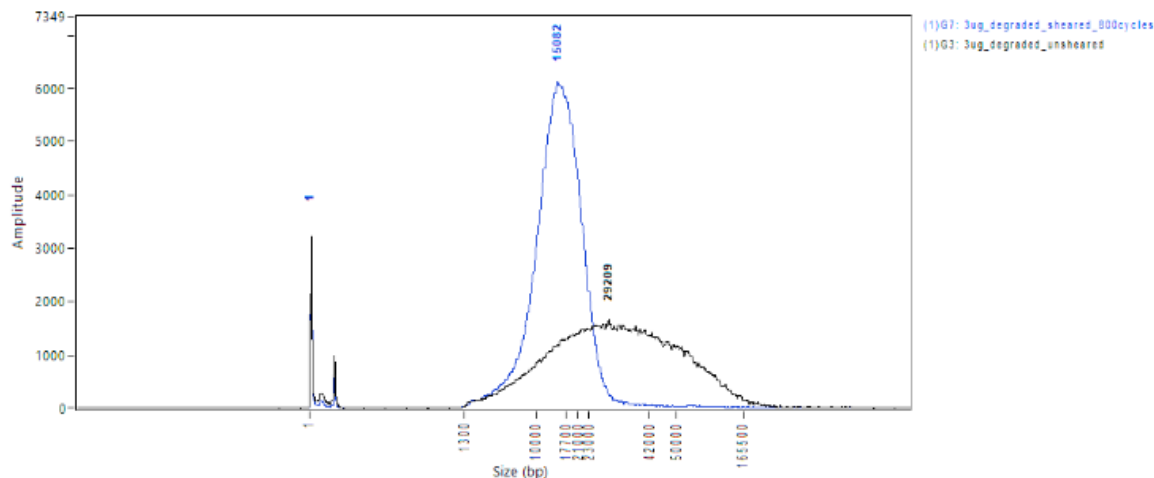
图 1. 剪切前后高分子量 (HMW) DNA 的情况

- (A) 剪切前 (黑色) 和剪切后 (蓝色) 的 3 $\mu$ g 高分子量 DNA。剪切后的 DNA 平均片段大小为 18,337 bp。  
(B) 剪切前 (黑色) 和剪切后 (蓝色) 的 5 $\mu$ g 高分子量 DNA。剪切后的 DNA 平均片段大小为 17,665 bp。

考虑到 DNA 样本往往源自质量不佳的材料，这些材料中的 DNA 在剪切处理前可能已经发生了一定程度的降解。例如，来自福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织的 DNA 就常常面临这样的问题。

为确认移液剪切是否适用于这些情况，我们分析了降解 DNA 的表现，分别使用 3  $\mu\text{g}$  和 5  $\mu\text{g}$  样本，且两者在 30 kb 阈值下的 GQN（基因组质量数值）为 4.5。这些样本的剪切结果同样满足文库构建所需的片段大小质量控制要求（图 2）。

#### A) 3 $\mu\text{g}$ 降解 DNA，剪切前后对比



#### B) 5 $\mu\text{g}$ 降解 DNA，剪切前后对比

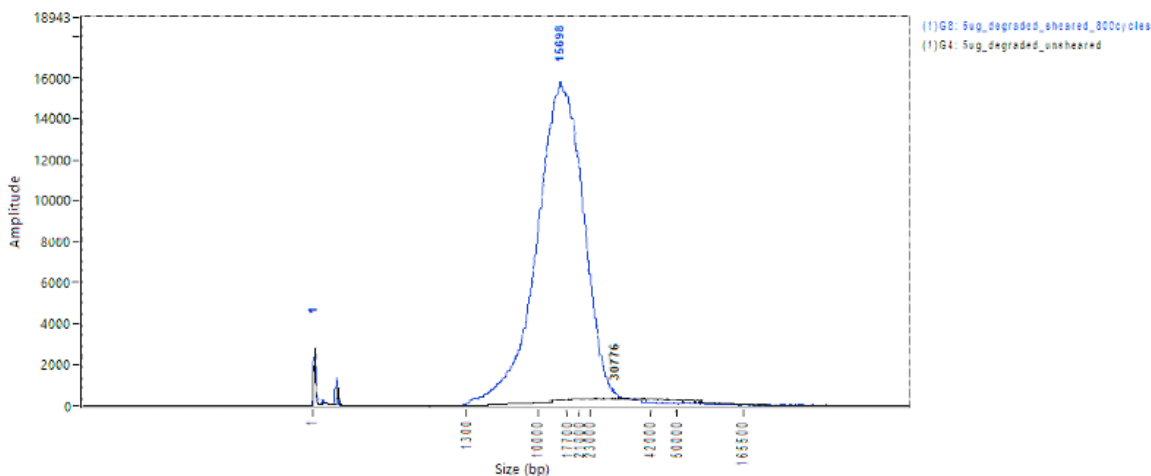


图 2. 剪切前后的降解基因组 DNA

(A) 剪切前（黑色）和剪切后（蓝色）的 3  $\mu\text{g}$  降解 DNA。剪切后的 DNA 平均片段大小为 15,751 bp。

(B) 剪切前（黑色）和剪切后（蓝色）的 5  $\mu\text{g}$  降解 DNA。剪切后的 DNA 平均片段大小为 15,916 bp。

## 结论

我们的研究表明，利用 Opentrons Flex 平台实现的自动化 DNA 移液剪切方法不仅适用于高分子量（HMW）DNA 样本，同样也能够有效处理已经发生降解的 DNA 样本。经过移液剪切处理后，这些 DNA 样本的片段大小均满足 PacBio 测序的特定要求。因此，我们可以得出结论：自动化移液剪切方法是其他机械剪切方法的可行且有效的替代方案，为 PacBio 测序的文库制备提供了更多的选择和便利。

[www.opentrons.com.cn](http://www.opentrons.com.cn)

☎ 0755-26417273

☎ 18098952246

✉ [Marketing.china@opentrons.com](mailto:Marketing.china@opentrons.com)



TRADEMARKS: OPENTRONS®, OPENTRONS DROP LOGO, OPENTRONS FLEX™ (OPENTRONS LABWORKS, INC.); PACBIO® (PACIFIC BIOSCIENCES OF CALIFORNIA, INC.). REGISTERED NAMES, TRADEMARKS USED IN THIS DOCUMENT, EVEN WHEN NOT SPECIFICALLY MARKED AS SUCH, ARE NOT TO BE CONSIDERED UNPROTECTED BY LAW.