

仪器设备研制与应用

超声波破碎仪在高通量测序中的应用

刘莉扬¹, 张博^{1,2}

(1. 清华大学自动化系, 清华信息国家实验室生物信息学研究部, 北京 100084;
2. 天津市国际生物医药联合研究院药物筛选联合计算中心, 天津 300457)

摘要: 高通量测序技术中的数据质量控制是测序过程中的重要问题, 样本文库的质量则是获取高质量的测序数据的前提和基础。在各种样本文库的制备过程中, 样本的片段化过程受到普遍关注。该文主要针对基因组 DNA 样本的片段化技术中, 涉及到的非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor 和自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220 的使用技巧和仪器的优缺点进行了初步比较。

关键词: 基因组 DNA; 高通量测序; 超声波破碎仪

中图分类号: R331-33 **文献标志码:** B **文章编号:** 1002-4956(2012)07-0049-05

Application of ultrasonic disrupter in high-throughput sequencing

Liu Liyang¹, Zhang Bo^{1,2}

(1. Bioinformatics Division, TNLIST; Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2. Joint Computational Center for Drug Discovery, Tianjin International Joint Academy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: Data quality control in high-throughput sequencing technology is an important problem in the sequencing process. The good sample library is the prerequisite for high-quality sequencing results. In particular, the process of sample fragments has still been under the spotlight. This paper preliminarily compares non-contact automatic ultrasonic disrupter Bioruptor with high performance Ultra-Sonicator Covaris S220 in utilization skills and their pros and cons involved in the fragmentation technique of genomic DNA samples.

Key words: genomic DNA; high-throughput sequencing; ultrasonic disrupter

1 高通量测序

自 2005 年 Nature 报道了 454 life science 公司的一种基于微乳液 PCR 技术的高通量测序技术以来^[1], 第 2 代高通量测序技术快速发展起来, 已经在许多领域得到了广泛的应用^[2-4]。多数高通量测序技术都是将片段化的基因组 DNA 加上相应的通用接头, 进行引物杂交和酶的延伸反应。由于所有的基因组 DNA 片段都在同一平面上, 这些反应就能够高通量地平行进行, 实现 1 次对几十万到几百万条

DNA 分子进行序列测定。同理, 每个延伸所掺入的荧光标记的成像检测也能同时进行, 获取数据后, 经过计算机软件分析获得 DNA 序列信息^[5-9]。高通量测序的最大优势就是 1 次可以平行做大量样本, 得到数据后, 在多个样本之间进行比较。如果样本处理参差不齐, 文库构建不理想, 将在很大程度上会影响数据质量, 从而导致分析结论上的偏差。因此, 在高通量测序中, 样本文库制备过程的平行性、可比性、重复性显得尤其重要。在保证较好数据质量的情况下, 3 大主流平台的 Roche 454 GS FLX Titanium 能测 450 bp, Illumina HiSeq 2000 能测 100 bp(单向)和 SOLiD 5500xl 能测 75 bp(单向)。这 3 种主流的第 2 代测序仪的平均读长基本在 100~400 bp 的范围内, 而基因组 DNA 的长度从几十 Kb 到几百 Mb, 甚至 Gb 不等^[10]。因此, 获得适当大小的 DNA 片段

收稿日期: 2012-02-29 修改日期: 2012-03-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50934004)

作者简介: 刘莉扬(1974-), 女, 北京, 硕士, 工程师, 研究方向为生物信息学。

E-mail: llyjody@tsinghua.edu.cn

是测序前样本文库制备的必要步骤。如果片段太长,会导致数据整理分析时拼接的困难;如果太短,会导致数据量的降低、浪费以及增加测序成本。在CHIP-seq和外显子捕获等测序中,片段的大小甚至决定了文库构建的成功与否。太大、太小都无法获得最终的理想数据。核酸片段化的技术主要分为3大类:一类是化学法,主要应用于mRNA的样本制备过程;一类是酶切,主要应用于数字基因表达谱(digital gene expression profiling, DGE)的样本制备过程;一类是物理法,主要应用于DNA, CHIP-Seq, Mate Pair的样本制备过程^[11-13]。本文主要关注的是物理法中应用最多的超声波破碎仪破碎样本的应用与技巧。

2 超声波破碎仪的选择

超声波破碎仪的基本原理是将电能转换为声能,这种声能使水(或其他液体)形成密集的小气泡,随着气泡震动和其猛烈的聚爆而产生机械剪切力,对基因组DNA进行物理性打断。超声波破碎仪的种类和型号都很多,为满足高通量测序样本文库构建的基本要求,选择仪器时要关注:(1)样本之间不能有任何交叉污染的可能,高通测序是灵敏的测试,只要有任何其他DNA在其中都会被当作测序对象进行测序,会造成测序数据的污染和不可信;(2)需要的样本量较少,一些临床样本,稀有动植物的样本,或残存物质中不可再获得的样本都是十分珍贵的,基因组DNA的提取量都不是很高,基本是微克级别,所以有些需要大量样本才能操作的仪器,在高通量测序文库构建中是不建议使用的;(3)可重复性要高,高通量测序的一个特点就是平行处理多个样本,如果破碎条件不稳定,那么意味着各个样本的可比性、重复性和稳定性很差,会造成实验不可重复。基于以上基本的3条,本文选择非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor 和自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220。根据不同的超声频率和强度可将DNA打断成相应大小的DNA片段,从而达到满足高通量测序的长度要求。本文主要的片段长短在100~500 bp之间。

3 仪器与主要试剂

仪器:非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor(比利时 Diagenode 公司),自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220(美国 Covaris 公司),电泳仪 PowerPac Basic Power Supply(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像系统 ChemiDoc XRS⁺(美国 Bio-Rad 公司),离心机 5424(德国 Eppendorf 公司),分光光度计 Nano-Drop2000(美国 Thermo Scientific 公司)

主要试剂:血液,组织,细胞基因组提取试剂盒(DP304 天根生化科技(北京)有限公司)。

4 实验方法

4.1 基因组 DNA 的提取

将适量新鲜的人的血液用血液、组织、细胞基因组提取试剂盒提取基因组DNA,用分光光度计检测定量。

4.2 超声波破碎基因组 DNA

4.2.1 使用非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor 破碎基因组 DNA

(1) 在5 mL离心管管中,加入100 μ L溶液(内含2 μ g基因组DNA),封口膜封口,备用;

(2) 调整相应参数:强度钮置“H”,时间钮置“30 s”,见图1;

(3) 添加适量碎冰于槽内,水添加到水位线,每5 min重新添加1次碎冰,以保证全过程在0 $^{\circ}$ C进行;

(4) 持续时间段分别为0、3、7、10、14、24、28、32、34、38、40 min;

(5) 仪器停止2 h后,每次1个样本,8个样本连续做,每个样本持续时间为20 min。



图1 Bioruptor 操作面板图

4.2.2 自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220 破碎基因组 DNA

(1) 将100 μ L、2 μ g基因组DNA放入Covaris S220专用小玻璃管(520045)中,盖好盖子,备用;

(2) 由于超声波主要是依赖时间和功率控制破碎强度,所以根据目的片段的大小调整参数,各参数见表1,在如图2所示的软件编辑界面分别进行调整。

表 1 Covaris S220 操作软件中参数设置表

目标长度/bp	Duty Factor/%	Peak Incident Power/W	Cycles per Burst	Time/s
150	10	175	200	420
200	10	175	200	180
300	10	140	200	80

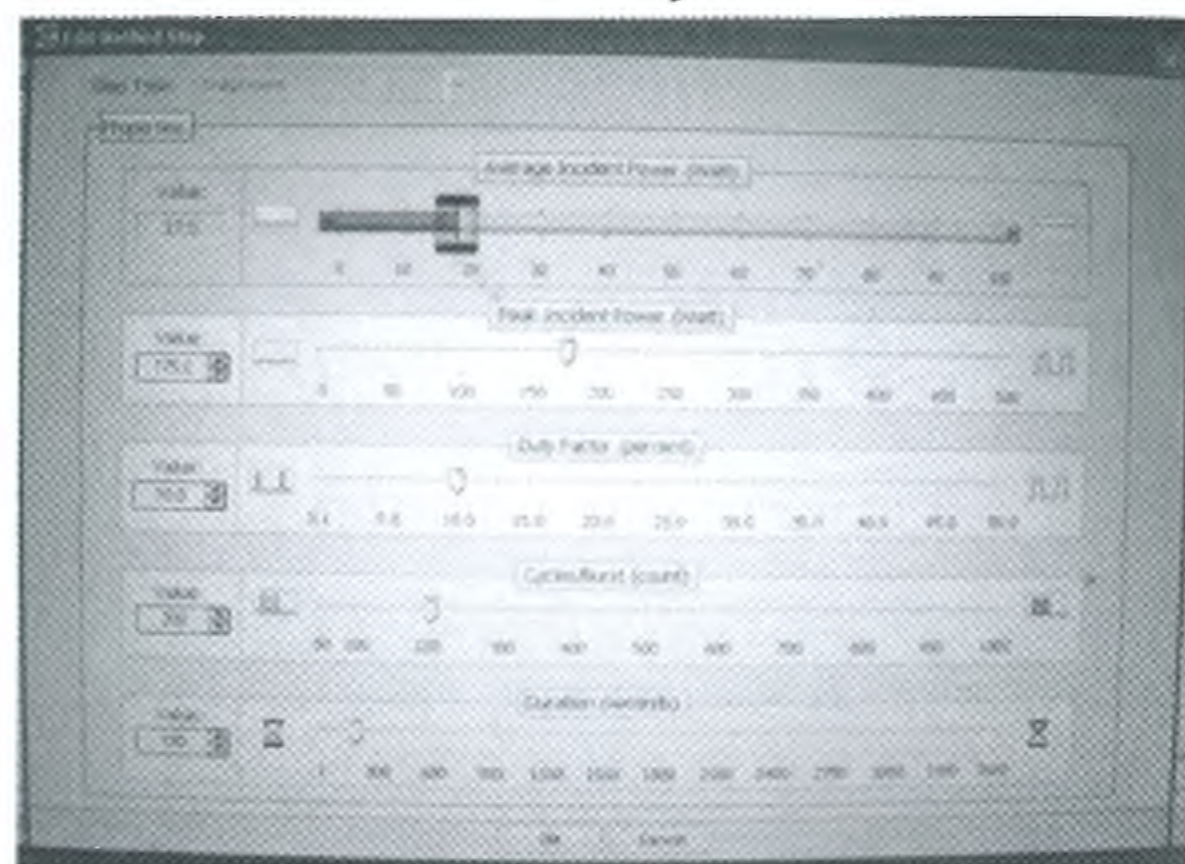


图 2 Covaris S220 操作软件界面图

4.3 超声波破碎后基因组 DNA 电泳检测

将以上 2 种方法制备的样品,用质量浓度为 20g/L 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,电泳后凝胶用 EB

染色,用凝胶成像系统 ChemiDoc XRS⁺ 进行拍照、观察和分析。

4.4 2100 生物分析仪检测

将 2 种超声波破碎的峰值在 300 bp 左右的基因组 DNA,用 2100 生物分析仪 DNA Chips 1000 进行检测。

5 结果与分析

5.1 超声波破碎仪仪器比较

2 台超声波破碎仪的性能、价格以及优缺点比较见表 2。可以看出非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor 的仪器价格相对低廉,不需要专门特殊的实验耗材,实验样本体积最低可达 50 μ L,但是操作相对繁琐、噪音大;自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220 的仪器价格昂贵,需要专门的实验耗材配合使用,样本所需最小体积为 100 μ L,但是操作简单、噪音小。

表 2 超声波破碎仪性能价格比较表

仪器名称	非接触式全自动超声破碎仪 Bioruptor	自动聚焦声波样本处理仪 Covaris S220
生产国家	比利时	美国
价格	1 万~2 万美元	5 万~6 万美元
工作原理	在水槽底部安装超声波发生装置,使水槽完全处于超声波的作用范围内	通过蝶形传感器产生超声波,作用于对应位置的小管
性能介绍	兼容常用的 50 mL, 1.5 mL 的离心管,每个试管都是全密封式的 可以破碎小量体积的样本(到 50 μ L) 连续地旋转试管能让能量均匀的分布 数据专一,且可以重复	兼容 13 mm \times 65 mm(15 mL)圆底玻璃管, 6 mm \times 16 mm(100 μ L) 圆底玻璃小管,每个试管都是全密封式的 数据专一,重复性好 一次一支管,破碎均匀,无污染 有冷凝管,破碎过程中保持水槽到指定温度(一般 4 $^{\circ}$ C)
优势	样本需要量小 可同时做多个样本 没有特殊耗材 运行成本比较低	可持续操作多个样本 重复性很好 超声环境良好稳定 噪音小
劣势	需要给水槽加冰 不能连续工作 30 min 以上,否则超声效率下降	专用耗材比较贵 样本体积需要量比较大,最小 100 μ L

5.2 超声波破碎仪破碎效果比较

Bioruptor 破碎凝胶成像电泳检测结果如图 3 中(a)和(b)所示;Bioruptor 破碎效率并不随着时间的延长而成正比增加,在 14 min 以后,破碎效果变化不显著。考虑是仪器不能连续工作时间太长,导致超声效率下降,设计了新的超声破碎实验过程,每次 1 个样本,每个样本 20 min,连续做 3 个样本。电泳检测结果如图

3 中(c)所示,同样的样本,同样的浓度,同样的超声条件,只是先后不同,发现随着时间的延长,破碎效率在下降,样本之间的片段差异在 200 bp 左右。

从图 4 中可以看出:Covaris S220 的超声效率很高,且连续工作效率很好。同样浓度的样本在不同的作用时间下,依然可获得相应大小的片段,其中 7 min 即可获得峰值 150 bp 的片段。

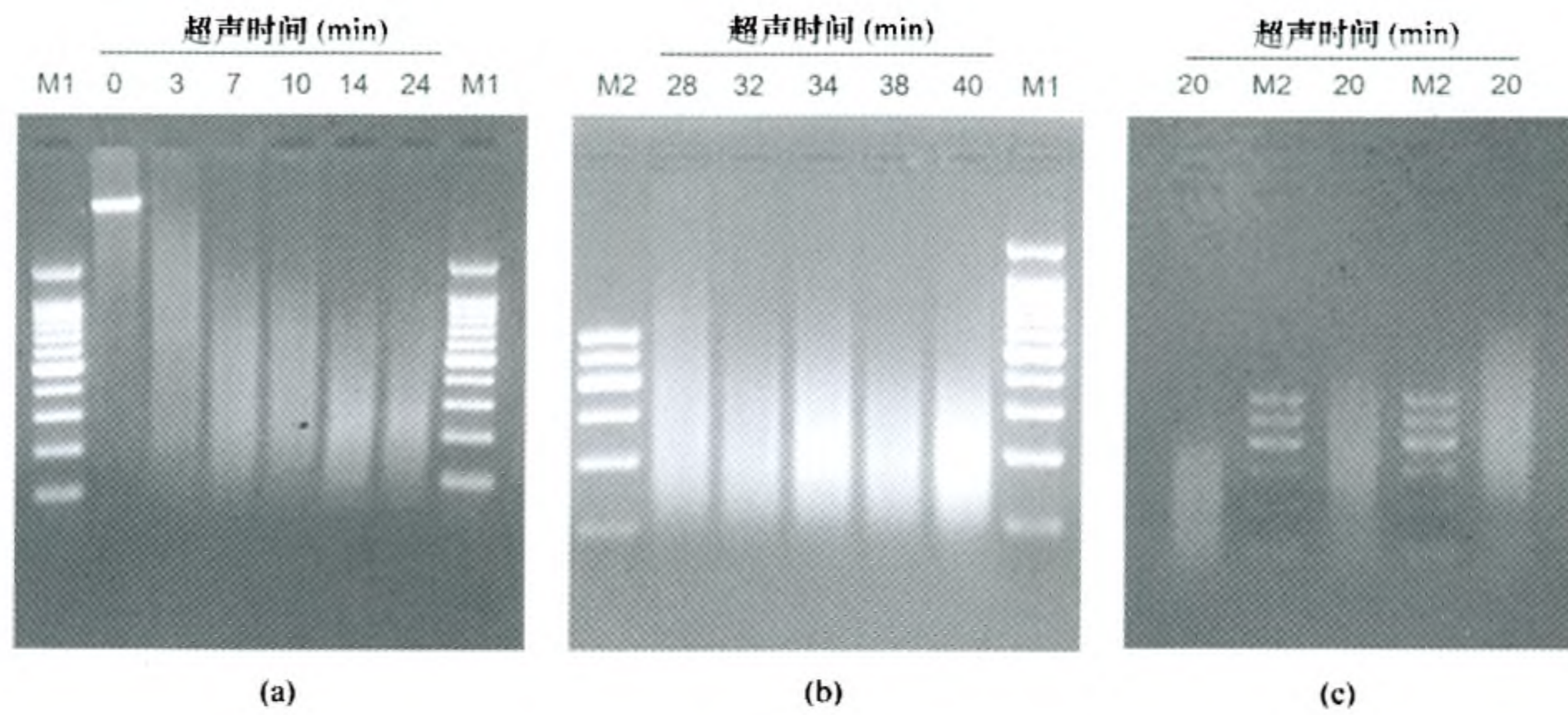


图3 Bioruptor 破碎凝胶电泳图

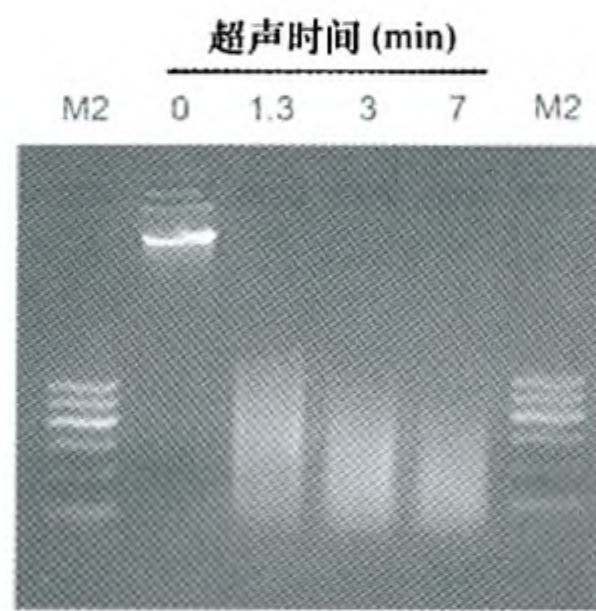


图4 Covaris S220 超声破碎凝胶电泳图

2100 生物分析仪分析结果如图 5 所示, (a) 为 Bioruptor 破碎的 300 bp 峰值的 DNA 片段; (b) 为 Covaris S220 破碎的 300 bp 峰值的 DNA 片段。经过比较, 可以看出二者的波峰跨度和面积基本一致, 也就是说破碎效果基本一样。

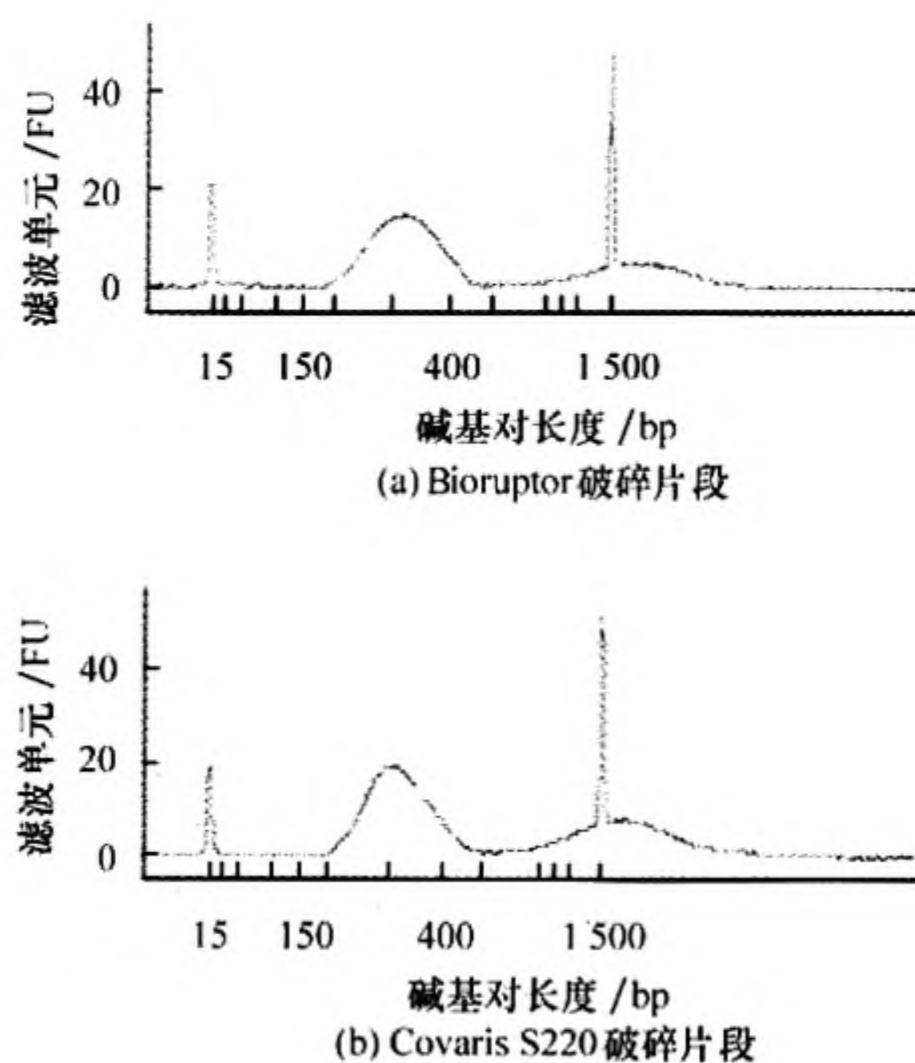


图5 生物分析仪 2100 分析结果图

2 种仪器的破碎效率比较见表 3。从表 3 可以看出, 要得到 300 bp 的目的片段, Covaris S220 只需要

耗时 1.3 min, 而 Bioruptor 却需要 14 min。由于过短的片段对于高通量测序没有太大意义, 所以未做 Covaris S220 在 14 min 和 20 min 破碎效果对比实验。

表3 破碎效果对照表

超声时间/min	Bioruptor 片段主峰/bp	Covaris S220 片段主峰/bp
1.3	>2 000	300
3	2 000	200
7	400	150
14	300	
20	200	

6 结论

本文涉及的实验主要是样本文库制备过程中样本片段化的处理。从以上实验结果分析得出的结论是:

(1) Covaris S220 可以在较短的时间里获得比较理想的片段, 重复性很好, 操作简单, 就高通量测序方向上的应用来说, Covaris S220 有很大优势。但是仪器和耗材比较昂贵, 而且这台仪器占实验台的面积比较大, 还需另配电脑配合操作;

(2) Bioruptor 价格相对低廉, 没有特殊耗材, 所占面积有限, 不需电脑操作, 在摸索好仪器的使用规律的前提下, 可以得到理想片段, 但是操作相对繁琐。总之, 2 台仪器在不同的实验室背景下, 各有所长。

参考文献 (References)

- [1] Margulies M, Egholm M, Altman W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. Nature, 2005, 437 (7057): 376-380.
- [2] Smith D R, Qu Inlan R, Peckham H E. Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies[J]. Genome Res, 2008, 18 (10): 1638-1642.
- [3] Bentley D R, Balasubraman I S, Swerdlow H P. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry

- [J]. Nature, 2008, 456 (7218) : 53-59.
- [4] Shaffer C. Next generation sequencing outpaces expectations [J]. Nat Biotechnol, 2007(25): 149.
- [5] Shendure J, Ji H. Next generation DNA sequencing [J]. Nat Biotechnol, 2008(26):1135-1145.
- [6] 李敏俐,关善辉,陆祖宏. 染色质免疫沉淀试验中基因组 DNA 超声破碎条件优化策略[J]. 生物技术通报, 2010(5):121-125.
- [7] Hashimoto S, Qu W, Ahsan B, et al. High-resolution analysis of the 5'-end transcriptome using a next generation DNA sequencer [J/EB]. PLoS One, 2009, 4(1):e4108.
- [8] Greilhuber J, Börsch T, Müller K, et al. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size [J]. Plant Biol (Stuttg), 2006, 8(6): 770-777.

- [9] Leitch I J, Soltis D E, Soltis P S, et al. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta) [J]. Ann Bot, 2005, 95(1): 207-217.
- [10] 聂志扬,肖飞,郭健. DNA 测序技术与仪器的发展[J]. 中国医疗器械信息, 2009, 15(10):13-16.
- [11] Schuster S C. Next generation sequencing transforms today's biology[J]. Nat Methods, 2008(5):16-18.
- [12] Sultan M, Schulz M H, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. Science, 2008(321): 956-960.
- [13] Von Bubnoff A. Next-generation sequencing: the race is on[J]. Cell, 2008, 132 (5) : 721-723.

(上接第 48 页)

后的峰面积和含水质量分数就成正比关系,而且 y 轴截距应该为 0。数据处理后得到的结果见表 2,表 2 中处理后的峰面积为在原始峰面积的基础上减去 N-H 收缩振动峰的面积。根据该结果作图(见图 3)并应用线性回归方程得到水质量分数和理论中的只有氢氧键贡献的峰面积关系为: $y = 0.40239 \cdot x + 0.0098$,误差为 0.0098%。通过进一步的数据校正处理得出 $y = 0.40239 \cdot x + 0.00571$,截距接近 0。与前面拟合得到的方程比较,可以认为在一定的误差和精度范围内该方法可行。

表 2 不同水含量标准样品处理后的红外光谱数据

含水量/%	高度相对值	处理后的峰面积相对值
0.000 00	0.097 60	0.000 00
0.071 95	0.098 43	0.133 45
0.123 80	0.099 80	0.314 93
0.144 79	0.100 55	0.365 97
0.284 19	0.101 58	0.501 48
0.203 60	0.101 73	0.506 71
0.302 00	0.104 22	0.903 21
0.429 00	0.104 93	1.072 31
0.512 40	0.105 41	1.131 29

4 结束语

应用数学方法对红外光谱法测得的花生油含水质量分数建立了模型和方法。该方法简单易行,操作简便,并且开发了 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 范围的红外光谱定量检测水分的应用,能够在一定的误差、精度范围内测量花生油含水质量分数。该方法可以快速科学地对部分较难测量的物质进行有效测量,也同时也为食用油的成分及杂质含量测评提供一定的技术支持。

参考文献(References)

- [1] 王玲,李志西,于修焯,等. 近红外光谱测定菜籽油中的水分含量

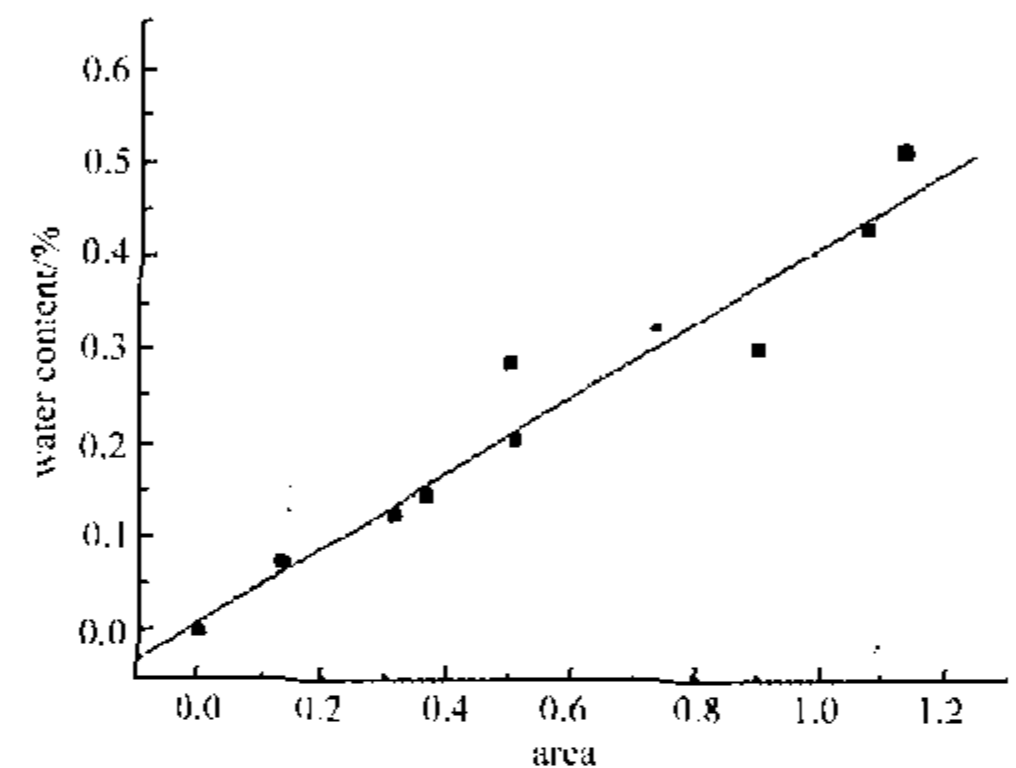


图 3 数据校正后花生油中水的质量分数与处理后的 3473 cm^{-1} 处吸收峰面积的关系图

- [J]. 中国油脂, 2010(3):74-77.
- [2] 徐振方,孟艳花,吴才章. 基于微波-卤素的智能快速水分测定仪 [J]. 仪表技术与传感器, 2011(1):27-29.
- [3] 曹文忠,乙小娟,蔡燕斌,卡尔·费休法测定进口液态氨基酸羟基类似物中的水分 [J]. 化学分析计量, 2008(3):72-73.
- [4] 方景春,赵敬. 近红外分析仪在玉米质量检测中的应用 [J]. 粮食加工, 2006(3):81-83.
- [5] 王远远,赖祥生,郑玉萍,等. 应用红外光谱法检测绝缘油中水分含量 [J]. 福建电力与电气, 2004(2):24-25.
- [6] 刘魁武,成芳,林宏建,等. 可见/近红外光谱检测冷鲜猪肉中的脂肪、蛋白质和水分含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009(1):102-105.
- [7] 赵锁芳,彭玉魁. 我国黄土区土壤水分、有机质和总氮的近红外光谱分析 [J]. 分析化学, 2002(8):978-980.
- [8] 李勇,魏益民,张波,等. 近红外水分稳健分析模型研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2005(12):1963-1967.
- [9] 邓芹英,刘岚,邓慧敏. 波谱分析教程 [M]. 北京:科学出版社, 2003: 69-76.
- [10] 吴性良,朱万森,马林. 分析化学原理 [M]. 北京:化工工业出版社, 2004:338-342.
- [11] 庞新安. 红外光谱 Excel 处理技术及其应用 [J]. 实验技术与管理, 2007, 24(6):71-73.
- [12] 耿春英. 红外光谱实验中谱图质量研究 [J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9):28-30.