

采用 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation 进行微生物全基因组测序

快速、灵活的文库制备，均匀覆盖微生物基因组。

简介

新一代测序（NGS）已成为分析小型基因组（≤ 5 Mb）的重要工具，包括细菌、病毒等微生物。微生物 NGS，包括全基因组测序（WGS）和靶向重测序，可对新生物进行基因组定位和从头组装，对已知生物进行完整基因组组装，并且可比较不同样本的基因组。然而，进行微生物 WGS 时，依赖于 PCR 的文库制备会产生偏向性，尤其是与溶液中的接头标记和片段化反应相结合时，这会导致基因组区域覆盖不均，特别是对于碱基组成极其不均匀的区域。

为了应对这一挑战，Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) 提供了磁珠固化转座酶 (On-Bead Tagmentation) 与 PCR-Free 工作流程相结合的创新解决方案 (图 1)。酶切法片段化是一种转座酶介导的反应，其将标记和 DNA 片段化整合到了同一个快速反应中。Illumina DNA PCR-Free 化学技术省去了 PCR 扩增步骤，并采用基于磁珠的化学技术，可为微生物 WGS 等灵敏应用提供高度准确的序列信息。

本应用白皮书展示了 Illumina DNA PCR-Free 作为微生物基因组组装综合工作流程的一部分所具有的出色性能，并展示了三种 GC 含量不同的细菌的测序结果。

方法

样本

DNA 来自 GC 含量不同的三种细菌 (表 1)，购自美国模式培养物保藏所 (ATCC)：蜡样芽孢杆菌 971 菌株 (ATCC，货号 14579D-5)，大肠埃希菌 MG1655 菌株 (ATCC，货号 700926D-5) 和球形红细菌 ATH 2.4.1 菌株 (ATCC，货号 17023D-5)。

表 1: 所测微生物基因组序列的 GC 含量

	蜡样芽孢杆菌	大肠埃希菌	球形红细菌
基因组大小	~5.4 Mb	~4.6 Mb	~4.1 Mb
GC 含量 (%)	~35%	~51%	~69%

文库制备

采用 Illumina DNA PCR-Free 试剂和标准工作流程，以 200 ng 细菌基因组 DNA (gDNA) 作为起始材料制备文库。为了进行比较，将 600 ng 细菌 gDNA 用 Covaris 超声破碎仪打断，随后进行 TruSeq™ DNA PCR-Free 工作流程。调整了超声处理和 TruSeq DNA PCR-Free 工作流程，以选择平均大小为 450 bp 的插入片段。

测序

混合文库在 MiSeq™ 或 NextSeq™ 550 测序系统上测序，运行配置为 2 × 150 bp。



图 1: Illumina DNA PCR-Free 工作流程——Illumina DNA PCR-Free 是全面且简化的微生物 WGS 工作流程的一部分，包括文库制备、测序和数据分析。

数据分析

测序完成后，数据从仪器直接传输到云端生态系统，使用 BaseSpace™ Sequence Hub 提供的 DRAGEN™ 应用程序进行一键式分析。DRAGEN Germline App v3.4.5 用于参考比对。

结果

为了评估 Illumina DNA PCR-Free 进行微生物 WGS 的性能，将结果与使用 TruSeq DNA PCR-Free 获得的结果进行比较。

稳定的文库产量，更低的起始量要求

对于所测试的微生物物种，Illumina DNA PCR-Free 的总文库产量与 TruSeq DNA PCR-Free 相当或更高（图 2）。值得注意的是，使用蜡样芽孢杆菌 gDNA（富含 AT 的基因组）进行文库制备时，采用 Illumina DNA PCR-Free 可显著提高产量。重要的是，与 TruSeq DNA PCR-Free 相比，Illumina DNA PCR-Free 能够在更低的 DNA 起始量下获得相近的文库产量（表 2）。

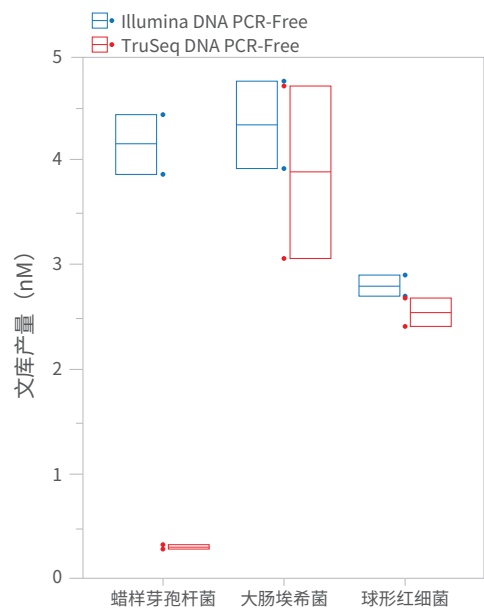


图 2: 比较具有不同 GC 含量的微生物基因组的文库产量——与 TruSeq DNA PCR-Free 相比，Illumina DNA PCR-Free 生成的测序文库具有相同或更高的产量。

表 2: 基因组构建指标

	蜡样芽孢杆菌		大肠埃希菌		球形红细菌	
文库制备	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
起始量	200 ng	600 ng	200 ng	600 ng	200 ng	600 ng
双端（PE）read 下采样	1M	1M	1M	1M	1M	1M
产量	4.5 nM	0.35 nM	3.9 nM	3.1 nM	2.7 nM	2.4 nM
基因组的平均比对覆盖度	52.2	51.0	61.1	62.5	58.7	59.9
基因组覆盖度均一性（% > 0.2 平均值）	98.9%	99.0%	99.3%	99.4%	96.9%	96.9%
比对百分比	96.3%	93.1%	97.2%	97.8%	92.4%	93.0%

均匀覆盖 GC 含量不同的基因组

为了评估低、中、高各种 GC 含量下对细菌基因组的覆盖性能，将来自 Illumina DNA PCR-Free 和 TruSeq DNA PCR-Free 的归一化覆盖度数据与参考基因组内容的 GC 百分比作图。无论 GC 含量如何，这两种试剂盒在所有测试的微生物物种中，均显示出均一的覆盖度水平（图 3，表 2）。为了进行比较，还采用 Illumina DNA Prep（包括 PCR）评估了基因组覆盖度。结果显示性能相当，但在 GC 含量极高或极低的情况下有一些偏差（图 3）。但是，Illumina DNA Prep 的性能优于在游离状态下进行酶切法片段化的文库制备试剂盒。

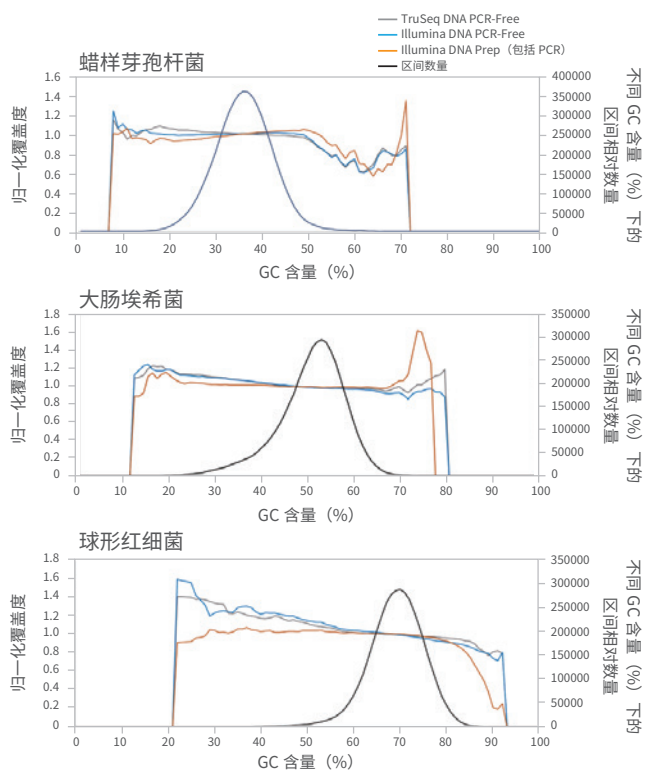


图 3: 不同 GC 含量下微生物基因组的 read 覆盖度比较——与 TruSeq PCR-Free（灰线）和 Illumina DNA Prep（橙色线）相比，Illumina DNA PCR-Free（蓝线）对不同 GC 含量的微生物基因组具有一致且相当的 read 覆盖度。钟形曲线（黑线）显示了每种微生物的实际 GC 组成。

TruSeq DNA PCR-Free

使用接头连接和加标签进行文库制备	手动文库定量和均一化	手动混合
5 小时	2 小时	0.5 小时

Illumina DNA PCR-Free, gDNA

使用PCR-Free 磁珠固化酶切法片段化方法进行文库制备	按体积混合
1.5 小时	0.5 小时

图 4: PCR-Free 工作流程比较——Illumina DNA PCR-Free 从酶切法片段化到文库纯化，总实验时间仅需 90 分钟，非常快速，而 TruSeq DNA PCR-Free 的总实验时间超过 7 小时。

磁珠固化转座酶和 PCR-Free 实验方案

Illumina DNA PCR-Free 提供了一种创新而强大的组合，可同时获得磁珠固化转座酶和 PCR-Free 化学技术的优势。磁珠固化转座酶采用连接在磁珠上的转座酶，与在游离状态下进行的酶切法片段化相比，该技术可实现更均一的酶切法片段化反应。连接在磁珠上的转座酶与 DNA 结合达到饱和后，不会再进行额外的酶切法片段化反应，从而能可靠地控制插入片段大小，并在 DNA 起始量超过 150 ng 时获得均一化产量^{1,2}。这大大地减少了文库制备前后的定量步骤。均一化文库可以按体积混合，从而避免对单个文库进行耗时的定量。与 TruSeq DNA PCR-Free 相比，Illumina DNA PCR-Free 省去了定量和 PCR 步骤，可节省大量时间（图 4）。

总结

Illumina DNA PCR-Free 提供了一种创新组合，可同时获得磁珠固化转座酶和 PCR-Free 化学步骤的优势。Illumina DNA PCR-Free 为微生物 WGS 提供了出色的易用性、均一的覆盖度和高度准确的数据，即使对于 GC 含量过高或过低的难测序基因组区域也是如此。

了解更多

如需了解更多有关 Illumina DNA PCR-Free 的信息，请访问 www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html

参考文献

1. Illumina (2018). *Nextera DNA Flex Library Preparation Kit*. Accessed April 10, 2020.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, Czyz A, Morrell N, et al. *Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation*. *BMC Genomics*. 2018;19(1):722.

Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279

北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855

技术支持热线 400-066-5835 · chinasupport@illumina.com · www.illumina.com.cn

© 2021 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为Illumina公司或其各自所有者的财产。关于具体的商标信息，请访问www.illumina.com/company/legal.html。770-2020-005-A QB10007



因美纳

因美纳讲堂

illumina[®]