

Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

高性能、快速、集成的工作流程，
适用于全基因组测序应用

- 文库制备性能经过优化，可产生高准确度和可靠的结果
- 灵活的工作流程适配多种样品类型和敏感测序应用
- 快速、自动化兼容的工作流程，总时间约为 1.5 小时，对 DNA 的起始量要求低

illumina[®]

简介

新一代测序 (NGS) 大大提高了每次运行生成的数据数量和质量, 并降低了成本, 缩短了获得结果的时间, 彻底改变了研究人员的基因组研究方式。尽管因美纳测序技术近年来发展迅速, 但基于 PCR 的文库制备方案仍面临着重大挑战。PCR 的偏向性会导致整个基因组区域的覆盖度不均, 尤其是碱基组成不均匀的区域。为了解决这一难题, Illumina DNA PCR-Free Prep Tagmentation (后文简称为 Illumina DNA PCR-Free) 将链接磁珠转座酶 (On-Bead Tagmentation) 和 PCR-Free 工作流程巧妙结合到了一起 (图 1)。

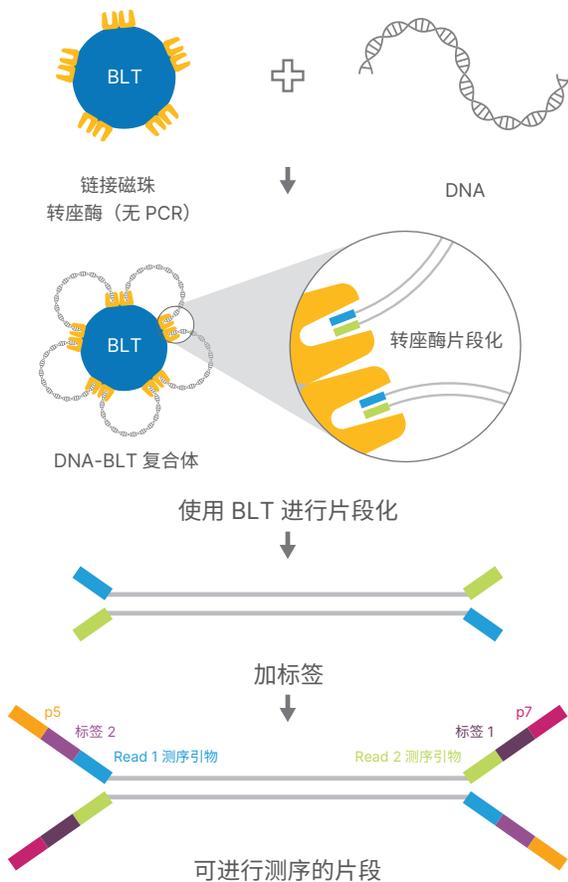


图 1: Illumina DNA PCR-Free 化学技术——有效的样本文库制备和加标签解决方案。

工作原理

转座酶片段化 (Tagmentation) 是一种转座酶介导的反应, 它将接头连接和 DNA 片段化结合到一个简单快速的反应中。链接磁珠转座酶采用连接在磁珠上的转座酶, 与在溶液中进行转座酶片段化相比, 该技术可实现更均一的转座酶片段化反应。当连接在磁珠上的转座酶与 DNA 结合达到饱和, 就不会再发生转座酶片段化反应, 从而实现一致的文库产量和均一的文库插入片段大小^{1,2}。此外, 通过省去 PCR 扩增步骤, Illumina DNA PCR-Free 化学技术避免了 PCR 反应引入的偏向性, 能为灵敏的应用提供高度准确的序列信息 (例如肿瘤 - 正常组织变异鉴定或人类全基因组测序 (WGS))。使用已提取的基因组 DNA (gDNA) 作为起始, Illumina DNA PCR-Free 检测可在 90 分钟内完成; 使用血液或唾液等原始样本时, 该检测可在 2.5 小时内完成 (表 1)。

表 1: Illumina DNA PCR-Free 规格

参数	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
DNA 起始材料类型	gDNA、血液、唾液、质粒、干血斑	gDNA
DNA 起始量	25 ng-300 ng ^a	1-2 µg
片段化方法	链接磁珠转座酶片段化	Covaris 超声破碎
样本多重分析	384 个双标签序列 ^b	96 个双标签序列
支持的基因测序仪	MiniSeq™、MiSeq™、NextSeq™ 550、NextSeq 1000、NextSeq 2000、NovaSeq™ 6000、NovaSeq X	所有的因美纳基因测序仪
总工作流程时间 ^c	约 90 分钟 (gDNA) ^d 约 2.5 个小时 (血液或唾液)	约 11 小时
插入片段大小 ^e	450 bp	350 bp 或 550 bp

a. Illumina DNA PCR-Free 的最大起始量为 2 µg。
b. 有关降低多重文库间差异性的标签序列校正策略, 请参阅《平衡全基因组测序的样本覆盖度》。
c. 总工作流程时间包括 DNA 提取与定量、转座酶片段化和文库混样步骤。
d. 饱和起始量 gDNA (300 ng) 的工作流程时间。
e. 有关将插入片段大小调整为 350 bp 或 550 bp 的更多信息, 请参阅《采用 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation 调节插入片段大小》。

在人类 WGS 中实现高度均匀的全基因组覆盖

覆盖度均一性可以衡量一轮测序在全基因组范围内的数据全面性。均匀覆盖可以更准确地检出与平均测序深度偏差较大的变异信息³。为了评估各种 GC 含量区域的覆盖度情况，我们绘制了 Illumina DNA PCR-Free 和 TruSeq™ DNA PCR-Free 的归一化覆盖度数据与人类基因组 GC 含量分组（百分比）相对应的图表。大部分人类基因组数据包含 20%-70% 的 GC 序列。两种试剂盒在人类 WGS 数据所示的广泛 GC 含量范围内，均显示出均一的覆盖度水平（图 2），表明 Illumina DNA PCR-Free 非常适合人类 WGS 应用。

均匀覆盖高 GC 或 AT 含量区域

由于人类基因组转录中的结构元件，人类基因启动子区域往往 GC 含量较高或较低，难以用 PCR 进行扩增⁴。采用无需 PCR 的试剂盒制备的人类 WGS 文库，在某些 GC 含量较高的启动子区域可能具有更高的覆盖度。为了比较 Illumina DNA PCR-Free、TruSeq DNA PCR-Free 和 TruSeq DNA Nano（包含 PCR）的覆盖性能，我们使用人类细胞系 NA12878 的 gDNA（Coriell 医学研究所）制备了文库。所有文库均在 HiSeq™ 基因测序仪上测序*，运行配置为 2 × 150 bp。将样本数据量调整到 32×-40× 的覆盖度。与 TruSeq DNA Nano 的数据相比，Illumina DNA PCR-Free 和 TruSeq DNA PCR-Free 的数据集在人 *RNPEPL1* 基因的高 GC 区域均具有更出色的覆盖度（图 3）。使用 Illumina DNA PCR-Free 可提高难测序区域的覆盖度。

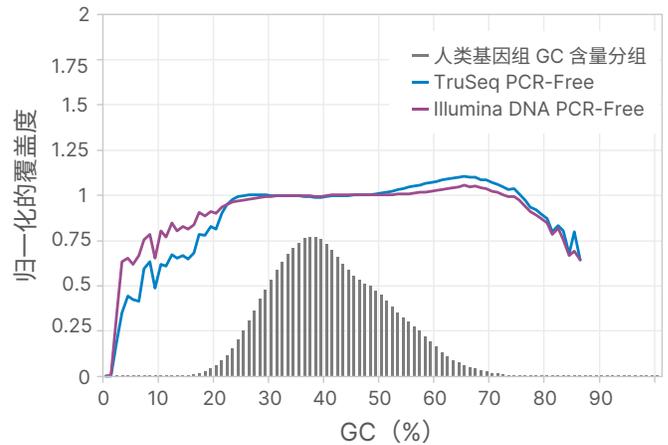


图 2: Illumina DNA PCR-Free 覆盖度均一性——Illumina DNA PCR-Free 在人类基因组的各种 GC 含量下均可实现均匀覆盖。

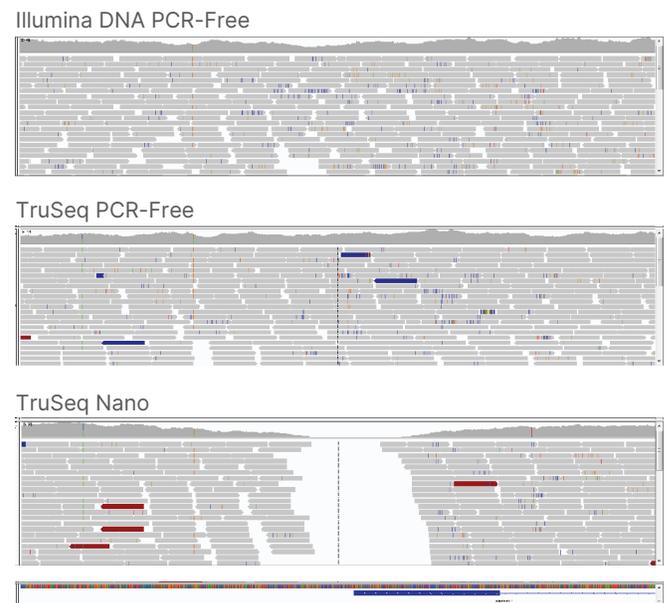


图 3: 高 GC 含量区域的 read 覆盖度比较——与 TruSeq DNA PCR-Free 和 TruSeq DNA Nano Library Prep Kit 相比，Illumina DNA PCR-Free 在人 *RNPEPL1* 基因高 GC 启动子区域的 read 覆盖度更高。read 图谱可通过 Integrative Genomic Viewer (IGV, 集成式基因组学浏览器) App 查看，该软件可通过 BaseSpace™ Sequence Hub 获取。

* HiSeq 基因测序仪已停止出售。不过，所提供的信息适用于表 1 所列的其他测序仪。

各种 DNA 起始量下均具有出色性能

我们评估了 Illumina DNA PCR-Free 在各种 DNA 起始量下的性能。采用人类细胞系 gDNA (Coriell 医学研究所, 货号 NA12878) 制备文库, TruSeq DNA PCR-Free 和 Illumina DNA PCR-Free 的起始量分别为 600 ng 和 20-200 ng[†]。在 NovaSeq™ 6000 基因测序仪上对文库进行测序, 运行配置为 2 × 150 bp, 取 40× 平均覆盖度下的数据进行分析。我们比较了质量分值、碱基检出和变异检测三个指标。每种文库类型的数据都非常准确, 在 NovaSeq 6000 基因测序仪上, 85% 以上的碱基得分在 Q30 或以上 (图 4A)。数据集还表明, 常染色体和外显子的碱基检出和变异检测性能相当 (图 4B)。所有不同 DNA 起始量 (包括 20 ng 的低起始量*) 下的数据质量、碱基检出和变异检测性能也是相当的。

链接磁珠转座酶和 PCR-Free 的实验方案

Illumina DNA PCR-Free 巧妙结合了链接磁珠转座酶和 PCR-Free 测序技术的强大优势。Illumina DNA PCR-Free 的磁珠饱和点为 ≥ 300 ng 的 gDNA。磁珠饱和能在 DNA 起始量大于 300 ng 时稳定控制插入片段大小并归一化文库产量。这有助于减少文库制备前后的定量步骤。同时, 浓度统一文库可以按体积进行混样, 无需对每个文库进行单独定量, 节省了大量时间。通过省去定量和 PCR 步骤, Illumina DNA PCR-Free 提供了一个精简的、90 分钟即可完成的实验方案 (图 5)。尽管起始量 ≥ 150 ng 时才能实现归一化, 但低至 20 ng* 的起始 DNA 就能产生可用的高性能文库。低起始量 DNA 的 PCR-Free 文库制备技术的实现可以解锁新的应用场景, 如干血斑 WGS 检测。

[†] Illumina DNA PCR-Free 的最大起始量为 2 µg。

用于高通量应用的高效样本多重分析

Illumina DNA PCR-Free 搭配 Illumina DNA Unique Dual Indexes (唯一双标签序列), 可以在因美纳基因测序仪上进行准确的样本拆分。多达 384 个标签序列为高通量测序项目提供了高度的灵活性。

兼容自动化的工作流程

Illumina DNA PCR-Free 具有快速且精简的工作流程, 与自动化高度兼容。由于基于磁珠的工作流程能提供稳定并归一化的文库, 因此用户可以从原始的血液或唾液样本开始, 使用 Flex Lysis 纯化核酸并直接进行文库制备, 无需任何定量步骤。这些特点使得在液体处理平台上自动化地批量处理原始样本的工作流程变得非常简单。

为了展示其与自动化的兼容性, 我们将 Illumina DNA PCR-Free 的自动化工作流程与 TruSeq DNA PCR-Free 以及两个竞争对手的基于酶的 PCR-Free 工作流程进行了比较。我们计算了在使用 Hamilton 液体处理机器人完成 96 个样本批次的文库制备时, 每个工作流程所需的手动操作次数、实验耗材、枪头数量和所需时间。比较结果表明, Illumina DNA PCR-Free 可以节约大量时间 (表 2)。

Illumina DNA PCR-Free 可节约成本

在制备 NGS 文库时, 实验耗材、枪头和 qPCR 试剂的消耗会增加额外成本。基于磁珠的技术的一个主要优点是, 可以对批量制备的所有文库自动进行基于磁珠的归一化, 无需对每个文库进行定量, 并且能简单地以相同体积进行文库混样。有关校正多重文库中标签序列相关的性能差异的策略, 请参阅技术说明《平衡全基因组测序的样本覆盖度》。

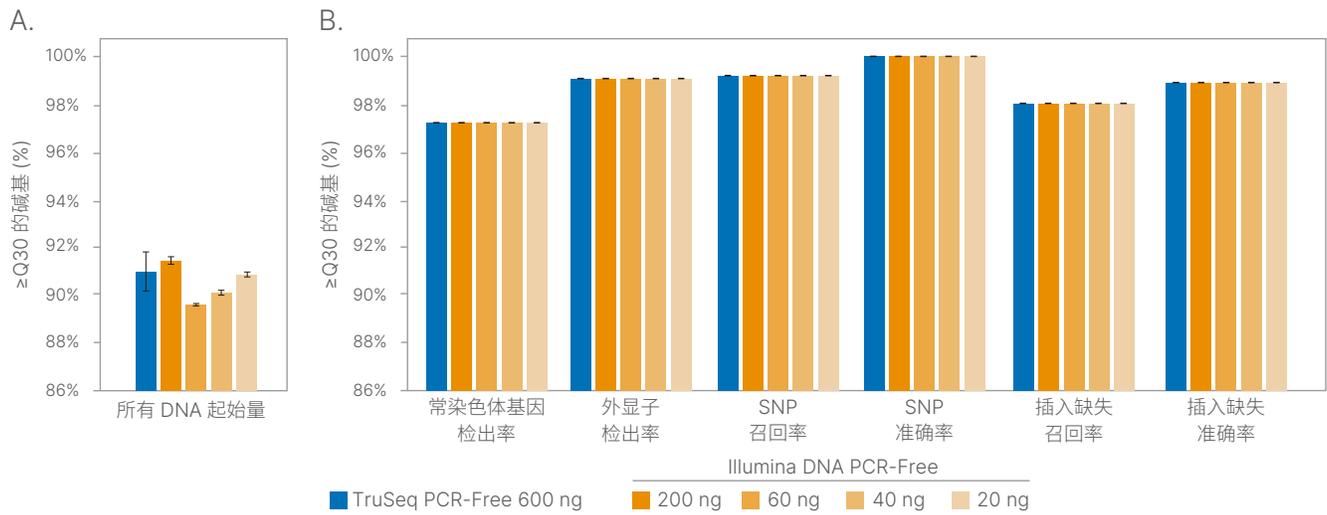


图 4: Illumina DNA PCR-Free Prep 在各种 DNA 起始量下的性能——采用各种 DNA 起始量制备的 Illumina DNA PCR-Free 文库表明, (A) 所有 DNA 起始量对应的文库均达到了质量标准, 并且 (B) 它们的检出能力相当。Q30 分值, 推断的碱基检出准确率为 99.9%; 常染色体基因检出率, 常染色体中基因型检出合格的非 N 参考位点的百分比; 外显子检出率, 外显子中基因型检出合格的非 N 参考位点的百分比; SNP, 单核苷酸多态性; 插入缺失, 插入缺失突变准确率 (准确度), 按 [真阳性检出数 / (真阳性检出数 + 假阳性检出数)] 的比值计算; 召回率 (灵敏度), 按 [真阳性检出数 / (真阳性检出数 + 假阴性检出数)] 的比值计算。

TruSeq DNA PCR-Free		
使用接头连接和加标签进行文库制备	手动进行文库定量和均一化	手动混样
5 小时	2 小时	0.5 小时

K 公司		
使用 K 公司的工作流程进行文库制备	手动进行文库定量和均一化	手动混样
约 2.5 小时	2 小时	0.5 小时

N 公司		
使用 N 公司的工作流程进行文库制备	手动进行文库定量和均一化	手动混样
约 2.5 小时	2 小时	0.5 小时

Illumina DNA PCR-Free, 血液或唾液		
Illumina Lysis Kit	使用无 PCR 的链接磁珠转座酶片段化进行文库制备	按体积混样
约 1.5 小时	1.5 小时	0.5 小时

Illumina DNA PCR-Free, gDNA	
使用无 PCR 的链接磁珠转座酶片段化进行文库制备	按体积混样
1.5 小时	0.5 小时

图 5: Illumina DNA PCR-Free 工作流程——Illumina DNA PCR-Free 工作流程从片段化或转座酶片段化到文库纯化的总实验时间为 90 分钟, 非常快。因美纳公司 2019 年存档数据。注意, N 公司采用了专有试剂以及因美纳的接头。

表 2：用于 96 个样本的自动化耗材^a

方法	样本类型	手动操作次数	96 孔样本板	枪头	时间
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5504	10 小时 10 分钟
K 公司	gDNA	13	19	4076	6 小时 21 分钟
N 公司	gDNA	13	17	3266	5 小时 42 分钟
Illumina DNA PCR-Free (+ 可选的 qPCR 池定量)	血液、唾液	2 (6)	10 (12)	2016 (2072)	2 小时 32 分钟 (4 小时 7 分钟)
Illumina DNA PCR-Free (+ 可选的 qPCR 池定量)	gDNA	2 (6)	8 (10)	1604 (1660)	1 小时 32 分钟 (3 小时 7 分钟)

a. 采用 Hamilton Star (96 道移液头 +8 通道液体处理系统) 上的 Hamilton 软件进行建模。qPCR 过程已包含在所有工作流程的自动化模型中 (基于每个样本)。假设除 Illumina DNA PCR-Free 以外的所有工作流程的每个样本均进行了 qPCR 测量、稀释和混样。样本混合基于 24 个样本的四个混合文库。因美纳公司 2019 年存档数据。注：N 公司采用了专有试剂以及因美纳的接头。

PCR-Free 方法制备的文库通常会用 qPCR 进行定量，Illumina DNA PCR-Free 可显著减少整个文库制备过程 qPCR 的使用次数 (如 PCR 文库扩增和文库制备后定量)，甚至完全无需使用 qPCR。一个包括 qPCR 试剂、实验耗材、定量试剂、枪头和第三方提取试剂盒在内的额外成本模型表明，Illumina DNA PCR-Free 工作流程可节约大量成本⁵。例如，TruSeq PCR-Free 工作流程中的额外成本约占总成本的 56%，竞争对手的基于酶的 PCR-Free Kit 中的额外成本约占 44%。[‡] 而 Illumina DNA PCR-Free 工作流程的额外成本仅占约 21%，显著低于其他文库制备试剂盒[†]。

总结

Illumina DNA PCR-Free 巧妙结合了链接磁珠转座酶和 PCR-Free 测序技术的强大优势。链接磁珠转座酶技术支持基于磁珠的归一化、简单地按体积进行文库混样，并省去了文库制备前后的定量步骤。PCR-Free 工作流程经过简化，缩短了整体工作流程耗时，同时能够对重复或不均匀的基因组区域实现高度均一的覆盖。结合 Flex Lysis 核酸纯化试剂盒，还能直接用血液、唾液和干血斑作为起始样本。Illumina DNA PCR-Free 可为一些灵敏应用 (如人类 WGS、微生物基因组的从头组装和肿瘤 - 正常组织变异检测等) 提供出色的易用性、均匀的覆盖度和高度准确的数据。

了解更多

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

† 文库制备试剂盒成本与此估算结果相匹配。额外成本是可变的，根据工作流程假设 (表 2) 计算出占总成本的比例。

订购信息

产品	货号
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 个样本)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 个样本)	20041795
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 个标签, 96 个样本)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 个标签, 96 个样本)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 个标签, 96 个样本)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 个标签, 96 个样本)	20091660
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221

参考文献

1. Illumina. Illumina DNA Prep. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf Published 2020. Accessed September 1, 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation. BMC Genomics. 2018;19(1):722. Published 2018 Oct 1. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf Published 2013. Accessed January 31, 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. Content analysis of the core promoter region of human genes. In Silico Biol. 2004;4(2):109-125.
5. Data on file. Illumina, Inc., 2019.

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) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
 市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2023 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳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.cn/company/legal.html。
 M-GL-00679 v2.0



illumina[®]