

illumina DNA PCR-Free 文库的最佳上样浓度

将 Illumina DNA PCR-Free 文库以最佳浓度上样至兼容的测序系统中，以获得高质量的测序数据。

简介

虽然 Illumina 新一代测序 (NGS) 技术近年来发展迅速，但依赖 PCR 的文库制备方案仍面临重大挑战。PCR 偏向性可能导致基因组区域覆盖不均，尤其对于碱基组成极其不均匀的区域。为了解决这一问题，Illumina 开发了用于文库制备的 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free)。这种先进的解决方案将磁珠固化转座酶 (On-Bead Tagmentation) 与 PCR-Free 工作流程进行了创新组合，为实现高度准确的 NGS 应用提供了所需文库，例如肿瘤 - 正常组织变异识别或人类全基因组测序 (WGS)。文库上样浓度对于测序成功与否至关重要，因为它决定了簇密度、数据产出和数据质量。本技术白皮书介绍了 Illumina DNA PCR-Free 文库在各种兼容的 Illumina 测序系统上的最佳上样浓度。

文库制备和最佳上样浓度

为确定最佳上样浓度，采用扩增仪标准实验方案由 300 ng 人类参考 DNA (Coriell, 货号 NA12878) 制备 Illumina DNA PCR-Free 文库。起始量为 300-2000 ng 基因组 DNA (gDNA) 时，文库产量已均一化，从而能够按体积等摩尔混合样本，只需在混合后进行一次定量。

样本混合后，使用 Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 货号 Q10212) 或 KAPA qPCR Library Quantification Kit (Roche, 货号 KK4824) 对制备的所有混合池进行定量。由于 Illumina DNA PCR-Free 文库为单链，NGS 文库中的片段大小分布通常无法通过毛细管电泳仪进行评估，例如生物分析仪 (Bioanalyzer) 或片段分析仪 (Fragment Analyzer)。因此，尽管文库是单链的，仍建议使用 450 bp 作为任意文库插入片段的长度中位数，以 660 g/mol 作为计算摩尔浓度的 DNA 质量。ssDNA 定量文库的摩尔浓度值可使用以下简化公式计算：

$$\text{摩尔浓度 (nM)} = \text{产量 (ng/}\mu\text{L)} \times 3.36$$

随后，将混合池用重悬缓冲液 (RSB) (表 1) 稀释至原液浓度，并根据各种 Illumina 测序系统的文库稀释与变性指南进行处理¹⁻⁵。尽管文库是单链的，但仍会对它们进行变性处理，以避免任何 DNA 二级结构影响测序效率。然后以 2 × 150 bp 的双端读长和 10 bp 标签 read 对制备好的文库进行测序 (NextSeq™ 550 系统除外，其读长应为 2 × 149 bp，标签 read 为 10 bp)。

Illumina DNA PCR-Free 工作流程需要使用定制测序引物。所有测序仪都需要 VP10 Read 1 定制引物，而 HiSeq™ 3000、HiSeq 4000、NextSeq 和 MiniSeq™ 还需要 VP14 标签 2 定制引物 (表 1)。使用 HT1

表 1：不同测序系统的推荐上样浓度

测序系统	基于 qPCR 值的计算值		基于 ssDNA Qubit 值的计算值		定制测序引物	
	原液浓度 (nM)	最终上样浓度 (pM)	原液浓度 (nM)	最终上样浓度 (pM)	VP10 Read 1 引物	VP14 标签 2 引物
NovaSeq 6000 标准工作流程	1.0-1.5	200-300	2.0-3.0	400-600	是	—
NovaSeq 6000 XP 工作流程	0.75-1	150-200	1.5-2.0	300-400	是	—
HiSeq 3000 和 HiSeq 4000 测序系统	3-3.5	300-350	6-7	600-700	是	是
HiSeq 2500 快速运行模式	2	9-10	4	18-20	是	—
HiSeq 2500 高通量模式	2	14-16	4	28-32	是	—
NextSeq 500 和 550 测序系统	2	1.3-1.4	4	2.6-2.8	是	是
MiSeq 测序系统 (v3 试剂) ^a	4	14-16 ^a	8	28-32 ^a	是	—
MiniSeq 测序系统	1	1.0-1.1	2	2.0-2.2	是	是

a. MiSeq 测序系统应采用实验方案 A，并将 0.2N NaOH 替换为 0.1 NaOH。

表 2：Illumina DNA PCR-Free 文库满足平台规定的性能指标

测序系统	簇密度		Q30 百分比		占位百分比	
	合格值	Illumina DNA PCR-Free	合格值	Illumina DNA PCR-Free	最佳	Illumina DNA PCR-Free
MiniSeq 测序系统	170-220 K/mm ²	201-220 K/mm ²	> 80%	86%-90%	—	—
MiSeq 测序系统 (v3 试剂)	1200-1400 K/mm ²	1223-1281 K/mm ²	> 80%	92%-94%	—	—
NextSeq 550 测序系统	170-220 K/mm ²	178-220 K/mm ²	> 75%	84%-91%	—	—
HiSeq 2500 快速运行模式	850-1000 K/mm ²	980-1018 K/mm ²	> 80%	92%-96%	—	—
HiSeq 4000 测序系统	—	—	> 75%	76%-82%	85%-95%	87%-88%
NovaSeq 6000 测序系统	—	—	> 75%	87%-91%	85%-95%	87%-93%

缓冲液预先配制 Illumina DNA PCR-Free 定制引物，然后可稀释至任意 Illumina 测序平台测序所需的最终浓度。为了确定每种测序系统的最佳上样浓度，在不同上样浓度下进行了多次运行。

最佳上样浓度的测序指标

以最佳上样浓度测序的 Illumina DNA PCR-Free 文库，在每种测序系统上都达到了性能规格指标（表 2）。这些性能指标包括：

- **簇密度**——非阵列式流动槽一个非常重要的指标，会影响运行质量、通过过滤的 read 数量、Q30 分值和总数据产出
- **质量分值为 30 (Q30)** ——相当于每 1000 次碱基检出中可能有 1 次错误，即碱基检出的准确率为 99.9%
- **占位百分比**——阵列式流动槽上具有可测序 DNA 的簇的百分比

由于非阵列式 (MiniSeq、MiSeq™、NextSeq 500、NextSeq 550 和 HiSeq 2500 测序系统) 和阵列式 (HiSeq 3000、HiSeq 4000 和 NovaSeq™ 6000 测序系统) 流动槽之间的簇生成机制不同，因此测通之间观察到的测序文库的插入片段大小也不同。这些大小差异并不反映文库制备的好坏。

虽然在 NovaSeq 6000、HiSeq 3000 和 HiSeq 4000 测序系统上，Illumina DNA PCR-Free 插入片段的长度中位数在 450 bp 左右波动，但在更低通量的系统上测序时，观察到的插入片段的长度中位数将减小 (< 400 bp)。起始 gDNA 降解和 / 或初始材料中存在抑制剂可能会进一步影响插入片段的长度中位数。然而，为了与 Illumina 建议的上样浓度保持一致，在文库摩尔浓度计算中需要使用 450 bp，与使用的测序系统类型无关。

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。770-2020-007-B QB10229

总结

Illumina DNA PCR-Free 结合了磁珠固化转座酶和快速工作流程，可生成高质量的测序文库。优化这些文库的上样浓度可确保获得高质量结果。本技术白皮书针对 Illumina 的各款测序系统为 Illumina DNA PCR-Free 文库提供了建议。

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 (2021). MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide. Accessed August 16, 2021.
2. Illumina (2019). MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide. Accessed May 11, 2020.
3. Illumina (2020). NextSeq 500 and NextSeq 550 Systems Denature and Dilute Libraries Guide. Accessed August 16, 2021.
4. Illumina (2019). HiSeq Systems Denature and Dilute Libraries Guide. Accessed May 11, 2020.
5. Illumina (2020). NovaSeq 6000 System Denature and Dilute Libraries Guide. Accessed August 16, 2021.



因美纳 因美纳讲堂

illumina®