

采用 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation 调节插入片段大小

只需对工作流程稍作修改即可调整文库的插入片段大小。

简介

新一代测序 (NGS) 读长是指从一个 DNA 片段中测得的碱基对数量。测序后, read 之间的重叠区域被用来将 read 与参考基因组进行组装和比对, 重建完整的序列。根据样本类型、应用和覆盖度需求等因素选择合适的测序读长。由于长 read 可实现更多的序列重叠, 因此可以更好地进行从头组装, 解决基因组的重复区域。对于其他应用, 例如表达分析或计数研究, 较短的 read 就已足够, 而且比较长的 read 更划算。测序读长决定了文库插入片段大小 (指接头序列之间的文库部分, 其长度恒定)。

通过 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free), 客户只需对文库制备工作流程稍作修改, 即可选择在标准大小 (450 bp) 的基础上, 将插入片段大小中位数上调或下调 100 bp¹。更广泛的插入片段大小范围为 Illumina DNA PCR-Free 带来了更大的灵活性, 有望用于更多不同类型的测序应用。本技术白皮书概述了在生成具有不同插入片段大小的文库时所需的工作流程更改, 以及由此获得的数据。

文库制备过程中的插入片段大小选择

制备文库时, 在两轮纯化中使用不同比例的样本纯化磁珠, 以选择合适的文库大小 (图 1)。在第一轮中, 较大的片段被去除, 在第二轮中, 较小的片段被去除。捕获大小在上下限范围之间的片段, 以进行纯化和测序。通过调整每一轮中使用的样本纯化磁珠的量可以选择片段 (插入片段) 大小。



图 1: Illumina DNA PCR-Free Library Prep——对标准工作流程稍作修改 (标有星号的步骤), 用户就能够调整文库插入片段的大小。

修改 Illumina DNA PCR-Free 工作流程

为了展示调整插入片段大小所需的细微工作流程修改, 在 Illumina DNA PCR-Free 文库制备过程中, 更改了第一轮和第二轮样本纯化磁珠的添加量, 以捕获不同的片段大小。根据之前的数据, 除了 450 bp 的标准插入片段大小之外, 还以长度中位数为 350 bp 和 550 bp 的插入片段为目标。采用不同比例的样本纯化磁珠来计算每轮要添加的磁珠体积 (表 1)。

表 1: 样本纯化磁珠添加和插入片段大小选择的推荐条件

第一轮 SPRI 时加入的体积	第一轮 SPRI 的倍数	第一轮 SPRI 磁珠的体积	总体积	转移到第二轮 SPRI 的体积	第二轮 SPRI 的倍数	第二轮 SPRI 磁珠的体积	平均插入片段大小	平均产量	目标插入片段大小中位数
45 µL	1	45 µL	90 µL	85 µL	2.5	63.8 µL	339 bp	14.2 nM	350 bp
45 µL	0.8	36 µL	81 µL	76 µL	1.8	42.2 µL	457 bp	7.4 nM	450 bp
45 µL	1.4	63 µL	108 µL	—	—	—	551 bp	5.6 nM	550 bp

缩写: SPRI, 固相可逆固定

结果

结果表明，本技术白皮书中所述的工作流程修改，成功捕获了大小为 350 bp 和 550 bp 的文库插入片段（图 2，绿色虚线）。尽管调整插入片段大小会影响捕获的文库总量，但每种插入片段大小下的文库产量足以测序（图 2）。用户应注意，在文库定量时需考虑不同的片段大小。

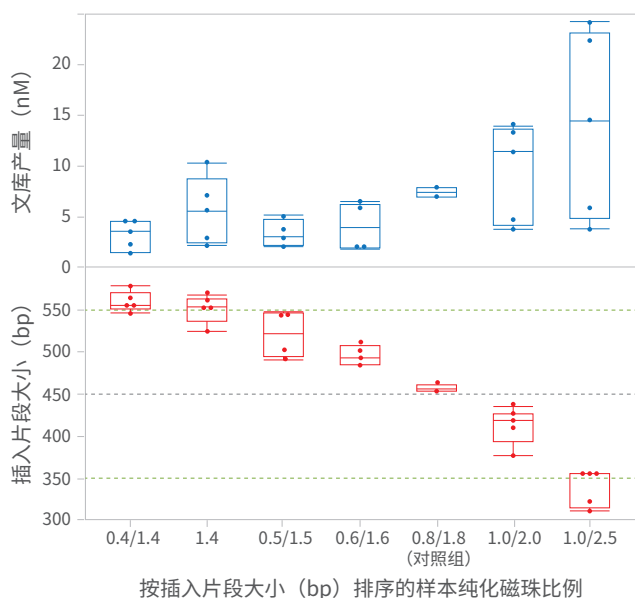


图 2: 工作流程修改后生成的文库插入片段大小和产量——将两轮片段大小选择中使用的不同比例的样本纯化磁珠与插入片段大小（红色框）和文库产量（蓝色框）作图。显示了 450 bp（灰色虚线）、350 bp 和 550 bp（绿色虚线）的目标插入片段大小。所有测试条件下的文库产量均足以进行测序。

与任何文库制备方法一样，片段大小不是单一的。相反，得到的是以目标插入片段大小为中心，其他不同长度的片段围绕其分布的文库。同样，本技术白皮书中对 Illumina DNA PCR-Free 工作流程的更改，得到的文库片段大小分布在长度中位数为 350 bp 和 550 bp 的插入片段周围（图 3）。

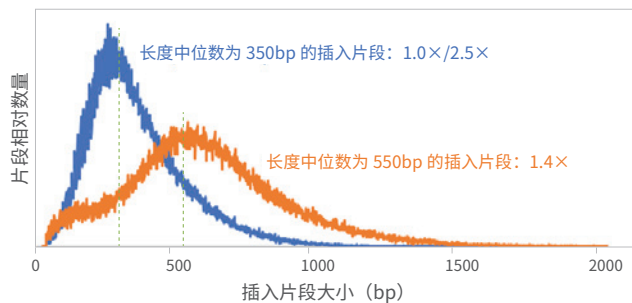


图 3: 片段大小分布——制备好的文库显示片段大小如预期分布在插入片段大小中位数（绿色虚线）的周围。

总结

本技术白皮书介绍了要获得 350 bp 和 550 bp 的插入片段，需要对标准工作流程进行的细微更改。能够在文库制备过程中调整目标插入片段大小，使 Illumina DNA PCR-Free 具有更大的灵活性，可用于更多不同类型的测序应用。

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 (2020) Illumina DNA PCR-Free, Tagmentation Reference Guide. Accessed March 26, 2020.

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。770-2020-004-A QB10009



因美纳 因美纳讲堂

