

# 用于高通量宏基因组学的 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程

该集成化、自动化的工作流程可生成高度均一的文库，为物种鉴定、宏基因组分析以及基因组从头组装提供优质数据。

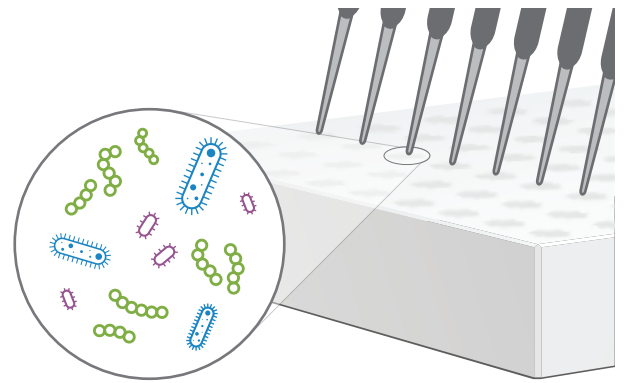
## 简介

最近几年，人们越来越关注人类微生物组鉴定及其在人类健康中的作用。肠道内的菌群可能影响免疫系统反应，预防某些疾病状态，或缓解某些不健康的状况<sup>1</sup>。诸如过敏和肥胖等慢性疾病都与微生物组的组成有关<sup>1,2</sup>。使用新一代测序（NGS）技术，可以极大地提高检测可培养和不可培养细菌以及人类微生物组中是否存在多种细菌物种的能力<sup>1</sup>。

对于微生物实验室而言，尽管 NGS 在速度、准确性和信息深度方面具备显著优势，但文库制备仍成为高通量实验室的瓶颈（图 1）。为了应对这一挑战，Illumina 与 PerkinElmer 携手合作，为宏基因组学提供了 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程。这是一个全面的 NGS 解决方案，支持从 DNA 提取到 DNA 分析的全自动化工作流程（图 2）。与手动制备样品相比，在液体处理系统上制备 Illumina DNA Prep 文库具有显著优势。主要优势包括通量更高，可扩展性更强，减少人为操作和人为错误，工作流程一致性增强，以及提高速度。

用于宏基因组学的 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程包括使用 chemagic 360 仪器（PerkinElmer）和 chemagic DNA Stool Kit Special（PerkinElmer）从粪便样本中自动提取 DNA。提取 DNA 后，在 Sciclone G3 NGSx 液体处理工作站（PerkinElmer）上使用 Illumina DNA Prep Library Preparation Kit（Illumina）制备文库。Illumina DNA Prep Library Prep Kit 具有创新的磁珠固化转座酶（on-bead tagmentation）技术，支持从各种生物体和样本中快速简便地制备文库<sup>3</sup>。该试剂盒可兼容广泛的 DNA 起始量范围（100–500 ng），无需对初始 DNA 样本进行准确定量，节省了文库起始量均一化所需的时间和成本<sup>3</sup>。

从 DNA 提取到最终文库混合池定量，用于宏基因组学的自动化 Illumina DNA Prep 文库制备工作流程可在不到 6 小时的时间内，提供多达 96 个可以进行测序的宏基因组文库。此应用白皮书使用 4 名受试者的粪便样本，以比较 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程与标准手动工作流程用于宏基因组学分析的性能。



**图 1：高通量宏基因组学**——宏基因组学实验室对复杂样本分析整个微生物群落，鉴定新物种，探索微生物群落与人类健康之间的联系。高通量宏基因组学实验室每周可能处理数百个样本，必须认真解决测序操作中的瓶颈问题。

## 方法

### 粪便收集

从 4 位捐赠者处采集粪便样本，其中两名是按西方饮食习惯的成年人，两名是素食主义的儿童（双胞胎）。在分离 DNA 之前，将粪便样本在 4°C 下储存 20 小时。



储存温度、时间、稳定缓冲液的存在与否以及储存管的选择等因素都会对 DNA 完整性产生重大影响。在本研究中，根据制造商方案，Illumina 将粪便样本储存在 Omega StableGUT Collection Device Tube（货号 AC7005，Omega Bio-Tek, Inc.）中，储存温度为 4°C。



图 2：用于宏基因组的 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程——Illumina 和 PerkinElmer 已经携手合作，为高通量宏基因组学创建了一个全面的自动化 NGS 文库制备工作流程。

## DNA 提取

使用 chemagic DNA Stool Kit Special（货号 CMG-1076，PerkinElmer），在 chemagic 360 仪器上进行提取（货号 2024-0020，PerkinElmer）<sup>4</sup>。每次分离均采用 150  $\mu$ L 洗脱液，其产生的纯化 DNA 总量为 300 ng–3  $\mu$ g。对提取方法进行优化后，30  $\mu$ L 可产生的 DNA 总量不小于 100 ng，这也是 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 的最大起始量。使用 LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer（货号 CLS137031，PerkinElmer）<sup>5</sup>、HT DNA NGS 3K Reagent Kit（货号 CLS960013，PerkinElmer）和 Genomic DNA Reagent Kit（货号 CLS760685，PerkinElmer）评估提取的 DNA 的完整性。采用 chemagic 方法可以从革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌物种实现 DNA 的理想分离。

## 自动化和手动文库制备

采用 Sciclone G3 NGSx 液体处理工作站（货号 CLS145321，PerkinElmer）<sup>6</sup> 和 Illumina DNA Prep Library Prep Kit（货号 20018705，Illumina），通过两次独立的自动化运行制备了 90 个 Illumina DNA Prep 文库。总 DNA 起始量范围（100–600 ng）与 Illumina DNA Prep 文库的推荐 DNA 起始量范围（100–500 ng）存在重叠。对于自动化的文库制备，使用固定体积的 30  $\mu$ L chemagic 纯化 DNA，确保每个文库的 DNA 起始量不小于 100 ng。为了比较 Sciclone G3 NGSx 脚本与 Illumina DNA Prep 手动方案的性能，根据标准方案手动制备了相同 DNA 分离物的 42 个文库的子集。

## 测序

为了生成足够的基因组覆盖度以深入宏基因组学分析，按体积混合了 48 个 Illumina DNA Prep 文库（每个 5  $\mu$ L）。采用 HT DNA NGS 3K Reagent Kit，通过 LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer 评估了混合文库，并使用 DNA 荧光计测量产量。采用 NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit（货号 20012860，Illumina），在 NovaSeq™ 6000 测序系统（货号 20012850）上对文库进行测序，运行配置为 2 $\times$ 150 bp。

## 数据分析

标签表达图是在 Illumina 基因组学计算平台 BaseSpace™ Sequence Hub 中生成的。采用 CosmosID Metagenomics<sup>7</sup> 和 Kraken Metagenomics<sup>8</sup> 应用程序编译宏基因组分析堆积条形图，所用的测序数据集调整至 300 万条 reads，最多可达 8000 万条 reads。可以通过 BaseSpace Sequence Hub 免费获取 CosmosID Metagenomics 和 Kraken Metagenomics 应用程序（图 3）。采用 MEGAHIT v1.1.1.<sup>9</sup> 和 QUAST v4.4<sup>10</sup> 评估基因组从头组装的质量，所用的数据集调整至 40 和 60 条双端 read。



### CosmosID Metagenomics

CosmosID

基于可靠的数据库，对物种、亚种和菌株水平进行快速可行的细菌鉴定。



### Kraken Metagenomics

BaseSpace Labs

Kraken Metagenomics 将分类标签分配至 DNA 短序列，灵敏度高且速度快

图 3：BaseSpace Sequence Hub 的宏基因组学应用程序——BaseSpace Sequence Hub 提供了许多宏基因组学分析应用程序，包括 CosmosID、Kraken、Prokka、QIIME 等。

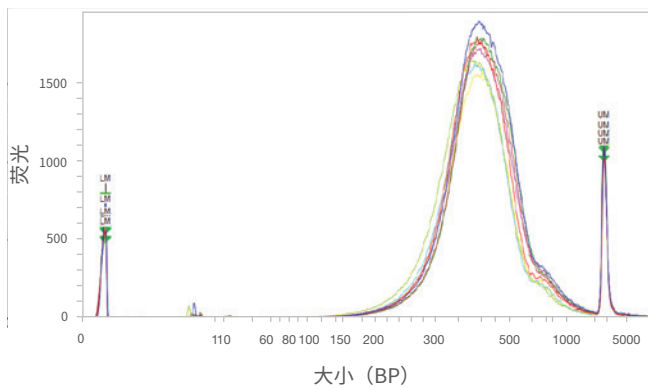


图 4：采用自动化工作流程制备的 8 个文库的插入片段尺寸分布——Illumina DNA Prep 工作流程可提供高度均一的插入片段尺寸分布，从而实现更均一的基因组覆盖度和数据准确性。该图显示了 LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer 的 8 个曲线图的叠加，代表了使用 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程制备的 8 个不同文库。

## 结果

### 自动化文库制备提供了均一的插入片段大小分布和标签表达

Illumina DNA Prep 技术的主要优势之一在于能够使用广泛的 DNA 起始量范围，同时可以保持一致且均一的插入片段大小和文库产量。插入片段大小分布和文库产量均一性的提高，可以确保更均一的基因组覆盖度和数据准确性。为了评估插入片段大小分布，使用 LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer 分析了采用 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程制备的 8 个文库。这些文库代表供体 1（成人）的两个 DNA 分离物重复样本，以及供体 3（儿童）的两个 DNA 分离物重复样本。每个 DNA 分离物产生两个重复的测序文库，总共产生 8 个文库。8 条 LabChip 曲线叠加，显示了高度均一的插入片段尺寸（图 4）。

为了进一步评估自动化 Illumina DNA Prep 工作流程的一致性，使用提取 DNA 的 7 种不同起始量（一式三份）制备了一系列文库。为了评估自动化文库制备法的产量，绘制了 21 个文库的序列池中每个文库识别的 read 百分比（通过过滤）（图 5）。标签表达的高度均一性表明文库产量的均一性，也表明每个文库在流动槽上呈现均匀表达。即使提取 DNA 起始量范围大，自动化 Illumina DNA Prep 文库制备工作流程制备的文库仍具有高度均一的标签表达。

### 自动化和手动 Illumina DNA Prep 方案产生的宏基因组分析结果相当

为了评估自动化和手动制备的 Illumina DNA Prep 文库在宏基因组分析方面的性能，对手动制备的文库和自动化制备的文库进行了测序并使用 Kraken 和 CosmosID Metagenomics 应用程序进行了分析（图 6

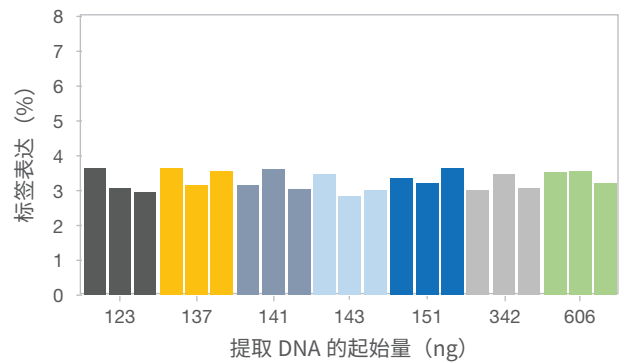


图 5：利用自动化工作流程对不同量的提取 DNA 制备的文库的标签表达——Illumina DNA Prep 工作流程针对广泛的 DNA 起始量产生一致且均一的标签表达。用提取 DNA 的 7 种不同起始量制备文库，按体积进行混合，一式三份进行测序。

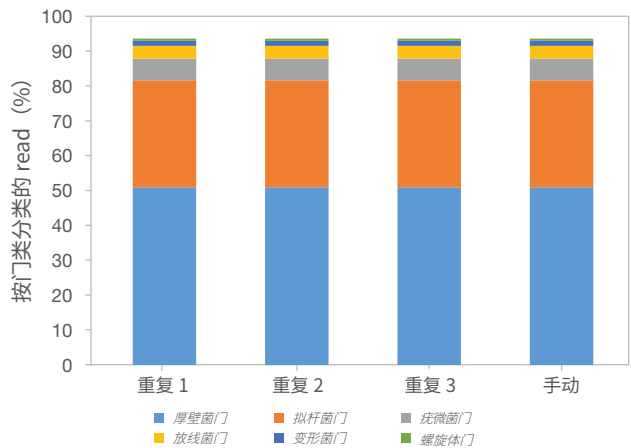


图 6：自动化和手动制备文库门类分布的比较——使用 Kraken Metagenomics 应用程序将自动化测序文库与手动制备文库进行对比分析，结果显示具有高度一致的细菌门类鉴定和分布。从供体 1 样本中生成的重复文库。

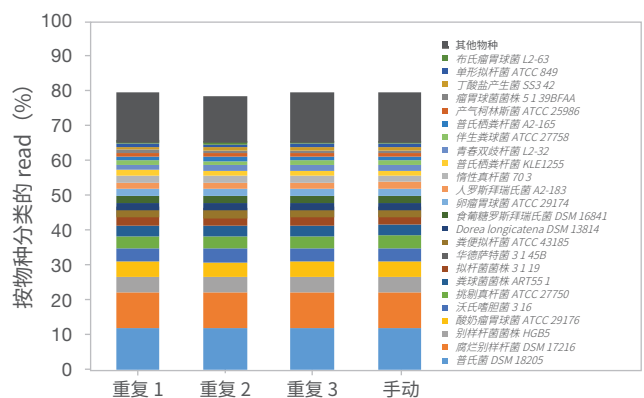


图 7：自动化和手动制备文库物种分布的比较——使用 CosmosID Metagenomics 应用程序将自动化测序文库与手动制备文库进行对比分析，结果显示具有高度一致的细菌物种鉴定和分布。

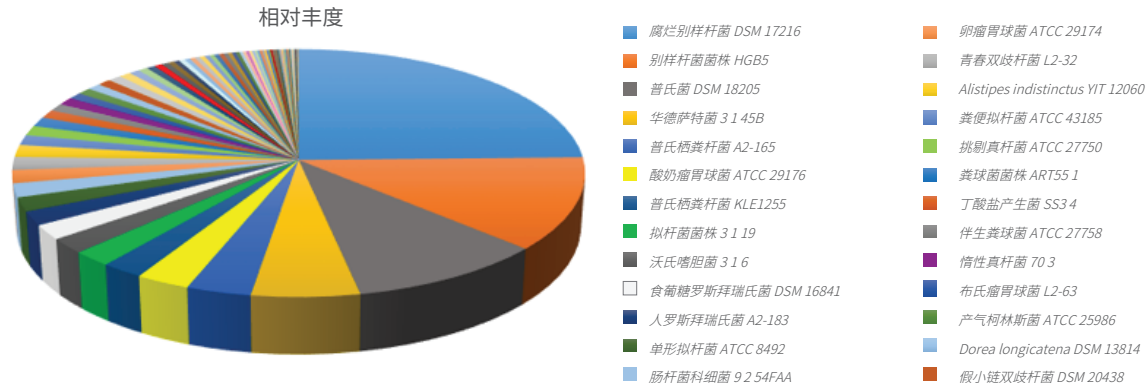


图 8：自动化文库产生丰富的宏基因组图谱——使用自动化 Illumina DNA Prep 文库制备工作流程从供体 2（成人）样本制备文库。使用 CosmosID Metagenomics 应用程序通过 4000 万条 read 组装相对丰度饼状图并识别 100 多个物种（在识别的 100 多个物种里，图例中只包含 26 种）。

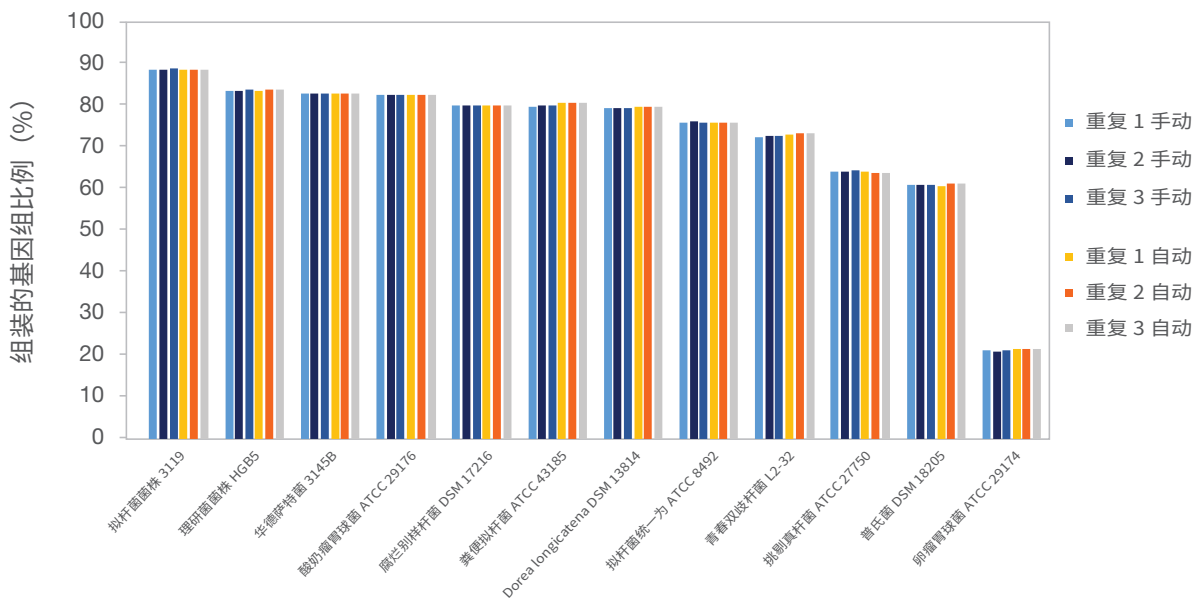


图 9：使用基因组组装对手动制备和自动化制备的文库进行对比——采用 6000 万条 read 通过 QUAST 对 12 个微生物进行基因组从头组装。使用自动化和手动方案，从供体 1 样本中制备文库，一式三份。

和图 7)。使用自动化 Illumina DNA Prep 文库制备工作流程制备的文库与手动制备的文库显示出相同的细菌门类和物种分布。此外，自动化工作流程能够识别供体 1 样本中的 100 多种物种（图 8）。

### 自动化和手动 Illumina DNA Prep 方案产生高质量宏基因组组装，结果相当

使用自动化和手动制备文库的相同数据集，使用 QUAST 计算组装的基因组分数百分比。通常，组装的基因组分数越高，说明基因组组装的质量越好。然而，组装基因组的百分比还取决于样本中特定物种的基因组与可用参考基因组之间的相似程度。在某些情况下，可用

的参考基因组可能不完全匹配。在本研究中，针对分析的 12 种生物体，自动化和手动制备的文库所产生的基因组组装结果几乎完全相同（图 8）。

## 总结

Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程是高通量宏基因组学实验室可用的出色解决方案。在不到 6 小时的时间内，自动化工作流程可以使用 chemagic 360 仪器 (PerkinElmer) 开展多达 96 次 DNA 提取，使用 Sciclone G3 NGSx 工作站 (PerkinElmer) 和 Illumina DNA Prep Library Prep Kit (Illumina) 可以制备多达 96 个文库。自动化工作流程可生成高度均一的文库，并为复杂微生物混合物（即使是具有挑战性的粪便样本）的物种鉴定和宏基因组学分析提供良好数据。Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程具有显著优势，包括更高的文库一致性、更少的手动操作步骤和更大的可扩展性，是实验室扩大运营规模以及利用新一代测序的理想文库制备解决方案。

## 了解更多

如需了解 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 的更多信息，请访问 [Illumina DNA Prep Library Prep](#) 页面

如需了解使用 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 进行微生物基因组测序的信息，请阅读利用 [Illumina DNA Prep 的微生物 WGS 应用说明](#)

## 订购信息

产品	货号
Illumina DNA Prep Library Prep Kit (24 样本)	20018704
Illumina DNA Prep Library Prep Kit (96 样本)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Nextera DNA CD Indexes (24 标签, 24 样本)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 标签, 96 样本)	20018708

**CD Index**：组合双端标签。提供 24 个双标签可支持多达 24 个样本，或提供 96 个双标签可支持多达 96 个样本。

## 参考文献

1. Guinane CM, Cotter PD. [Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ.](#) *Ther Adv Gastroenterol.* 2013;6:295–308.
2. Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, et. al. [The gut microbiota and its relationship to diet and obesity.](#) *Gut Microbes.* 2012;3:186-202.
3. Illumina (2017). [Illumina DNA Prep Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
4. Chemagic 360 instrument, PerkinElmer (2016). [Compact, High Volume, High Throughput Nucleic Acid Isolation.](#) Accessed April 17, 2018.
5. LabChip GX Touch, PerkinElmer (2016). [Automated, High Performance Electrophoresis for Genomics.](#) Accessed April 17, 2018.
6. Sciclone G3 NGSx Workstation, PerkinElmer (2017). [Sciclone G3 NGSx Workstation for High Throughput Sequencing Sample Prep Applications.](#) Accessed April 17, 2018.
7. CosmosID Metagenomics. [www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/cosmosid-CosmosID-metagenomics-know-now.html](http://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/cosmosid-CosmosID-metagenomics-know-now.html). Accessed April 12, 2018.
8. Kraken Metagenomics. [www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/kraken-metagenomics.html](http://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/kraken-metagenomics.html). Accessed April 17, 2018.
9. MEGAHIT v1.1.1. [github.com/voutcn/MEGAHIT](https://github.com/voutcn/MEGAHIT). Accessed April 12, 2018.
10. QUAST v4.4. [quast.sourceforge.net/quast.html](http://quast.sourceforge.net/quast.html). Accessed April 13, 2018.

## 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](mailto:chinasupport@illumina.com) · [www.illumina.com.cn](http://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](http://www.illumina.com/company/legal.html)。出版号 770-2018-007-A QB 6389



illumina®