

用于宏基因组学新一代测序的 Nextera™ 粗裂解物实验方案

使用 Nextera 粗裂解物实验方案的 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 可进行快速、准确的宏基因组学分析并提供高质量的从头基因组组装数据。

简介

新一代测序 (NGS) 技术已成为宏基因组学研究中用于生物体鉴定、宏基因组学分析和从头组装的重要工具^{1,2}。Nextera 文库制备系列产品带来了诸多工作流程优势, 可以更快、更高效地为宏基因组学应用制备文库 (图 1)。酶切法片段化化学技术以及 Nextera DNA 和 Nextera XT DNA Library Preparation Kit 的发布在单个反应中整合了 DNA 酶切法片段化和接头标记步骤³。利用创新的磁珠固化转座酶 (On-Bead Tagmentation), Illumina DNA Prep Library Prep Kit 通过整合 DNA 提取、定量、酶切法片段化和文库归一化步骤, 进一步简化了文库制备工作流程⁴。

尽管基于 NGS 的全基因组测序 (WGS) 为微生物实验室提供了在速度、准确性和信息深度方面的显著优势, DNA 提取和文库制备步骤仍是 NGS 工作流程中的一大瓶颈。制备用于宏基因组学研究的 NGS 文库通常首先进行耗时耗力的基因组 DNA 提取步骤。为解决宏基因组学面临的这一困难, Illumina 公司提供了可开展 Nextera 粗裂解物实验方案的 Illumina DNA Prep Library Preparation Kit, 这是一种可以直接从粗裂解物快速简便地制备文库的文库制备方法。直接对粗裂解物进行测序节省了与 DNA 提取步骤相关的时间和成本。除了提高速度和效率之外, Illumina DNA Prep Library Preparation Kit 还可以灵活地支持各种起始样本类型和细胞裂解方法, 包括细菌菌落、血液和唾液。

本应用白皮书使用模拟微生物群落和真实的人类粪便样本展示了使用 Nextera 粗裂解物实验方案的 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 的性能。本应用白皮书也证明, Illumina DNA Prep Library Prep Kit 具有先进的化学技术和更快的工作流程, 在宏基因组学分析以及从头组装方面的性能超越了原始的 Nextera DNA Library Prep Kit*。

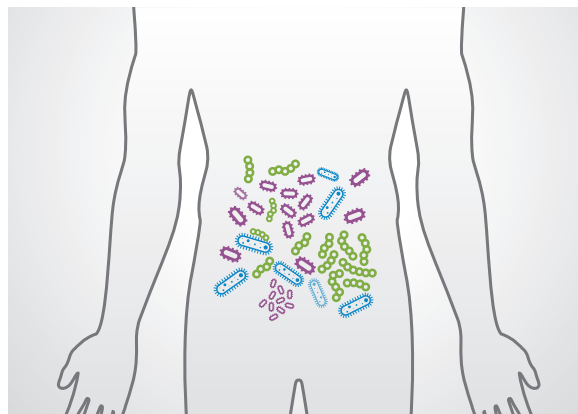


图 1 : Nextera 粗裂解物实验方案, 用于宏基因组学——使用 Nextera 粗裂解物实验方案的 Illumina DNA Prep Kit 可以从粗裂解物直接制备文库, 能够节省更多的时间和成本, 同时保持数据的一致性和质量。

方法

样本来源

为了模拟微生物群落, 使用了 20 个菌株的均匀混合基因组材料 (ATCC MSA-1002)、20 个菌株的交错混合基因组材料 (ATCC MSA-1003) 和 20 个菌株的均匀混合全细胞材料 (ATCC MSA-2002)。20 个菌株的均匀 / 交错混合基因组材料包含纯化的 DNA, 提取自 20 个细菌菌株, 而 20 个菌株的均匀混合全细胞材料是全 (未裂解) 细胞的混合物。这些混合物中的物种是根据其多样化的基因组大小、GC 含量范围和革兰氏染色特征选择的。此外, 该 20 个菌株混合物中的微生物进行了全基因组测序并对基因组进行了表征。为了代表真实的宏基因组学样本, 从健康供体和接受药物治疗的患者获取了粪便样本。

* 原始的 Nextera DNA Library Prep Kit 和 Nextera XT DNA Library Prep Kit 使用传统片段化化学技术, 而 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 使用先进的磁珠固化转座酶化学技术。与原始的酶切法片段化化学技术相比, 磁珠固化转座酶化学技术提供更均一的文库、大小一致的插入片段以及均一的基因组覆盖度。

从模拟微生物群落获得粗裂解物并提取 DNA

为了制备粗裂解物，按 [Nextera 粗裂解物实验方案](#) 所述，使用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit (货号 A29790, ThermoFisher) 处理 200 μ L 20 个菌株的均匀混合全细胞样本。使用来自步骤 H 的上清作为粗裂解物，该步骤包含将匀浆后细胞的上清转移至干净试管⁵。为了提取 DNA，用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit 使用完整的实验方案处理了相同数量的细胞。Nextera 粗裂解物实验方案与多种细菌 DNA 提取试剂盒兼容 (表 1)。

从粪便样本制备粗裂解物并提取 DNA

按 Nextera 粗裂解物实验方案，用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit 使用来自供体患者的粪便样本制备粗裂解物并提取 DNA。使用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit 处理 0.05 g 粪便样本。使用来自步骤 G 的上清液作为粗裂解物，该步骤包含将匀浆后细胞的上清液转移至干净试管⁶。为了提取 DNA，用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit 使用完整实验方案处理了相同量的起始材料。由于存在胆汁、盐和多糖等 PCR 抑制剂，粪便样本可能具有很高的抑制性。受抑制的文库制备产物不能在纯化步骤沉淀，或者产生的文库产量较低。对于某些高抑制性样本，可能需要将裂解物的量减少至建议量以下。Nextera 粗裂解物实验方案与多种粪便样本纯化试剂盒兼容 (表 1)。

表 1：DNA 提取及裂解物制备试剂盒^a

用于细菌样本的试剂盒
PureLink Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher)
UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO)
ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit (ThermoFisher)
用于粪便样本的试剂盒
PureLink Microbiome DNA purification kit (Invitrogen)
PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO)
PowerFecal DNA Isolation Kit (MOBIO)
QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen)

a. 要获取使用这些试剂盒获得粗裂解物的建议取样和裂解方法，以及建议的粗裂解物起始量，请下载“[Nextera 粗裂解物实验方案指南](#)”。

文库制备及测序

为测试 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 进行物种鉴定和宏基因组学分析的准确性和灵敏度，将来自 20 个菌株的交错混合基因组材料样本的 10 ng DNA 直接加入 Illumina DNA Prep Library Prep Kit (货号 20018704, Illumina) 并使用标准实验方案制备 (提取的 DNA)。

为比较粗裂解物和提取 DNA 的性能，使用来自 20 个菌株均匀混合全细胞样本或来自粪便样本的 5 μ L 裂解物或 5 μ L 提取的 DNA 制备了测序文库。裂解物和提取的 DNA 样本用于 Illumina DNA Prep Library Preparation Kit，使用 Nextera 粗裂解物实验方案或标准实验方案。使用 Nextera 粗裂解物实验方案进行文库制备显著减少了文库制备工作流程的总时间和手动操作步骤 (图 2)。通过使用粗裂解物直接作为 Illumina DNA Prep Library Preparation Kit 的起始材料，无需昂贵且耗时的 DNA 定量试剂盒。

为比较 Illumina DNA Prep Library Preparation Kit 和原始的 Nextera DNA Library Preparation Kit (货号 FC-121-1030, Illumina)，将来自 20 个菌株均匀混合基因组材料的 50 ng DNA 和来自 20 个菌株交错混合基因组材料的 50 ng DNA 直接加入了上述文库制备试剂盒。使用标准实验方案制备文库。

所有文库在 NextSeq™ 550 测序系统上使用 NextSeq 500/550 High Output v2 Kit (货号 FC-404-2004, Illumina) 以 2 × 150 bp 双端 read 配置测序。

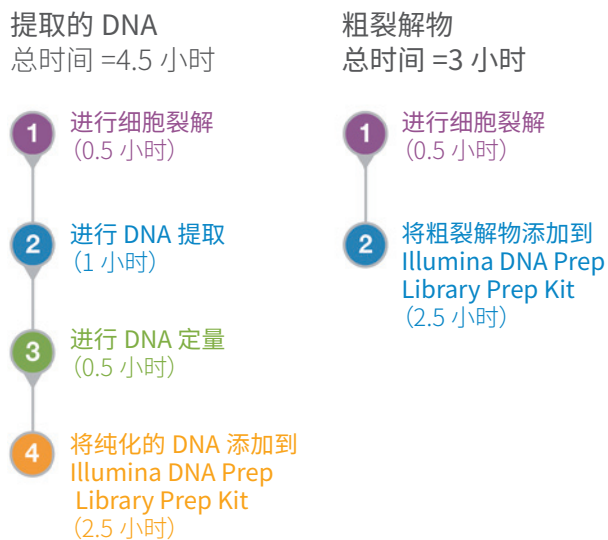


图 2：提取的 DNA 与粗裂解物工作流程的比较——Nextera 粗裂解物实验方案减少了文库制备实验方案的时间和手动操作步骤。粗裂解物实验方案也减少了与额外的纯化和定量步骤相关的时间和成本。通过假定具体方法计算工作流程时间：DNA 提取 (PureLink Microbiome DNA Purification Kit)、DNA 定量 (Qubit)。时间长短因使用的设备、试剂盒、样本批次数量、自动化程序和用户经验而异。

数据分析

使用 One Codex⁷ 平台计算宏基因组学分析参数，包括真阳性、相对丰度、假阳性、实测丰度以及预期丰度。使用 2 个软件工具生成基因组组装条形图。首先使用 MEGAHIT v1.1.1.⁸ 对 FASTQ read 进行从头比对，产生重叠群 (contig)，然后用 Quality Assessment Tool for Genome Assemblies (QUAST)⁹ 使用已知参考基因组评估重叠群。使用 GENIUS Metagenomics 软件绘制宏基因组学分析堆积条形图¹⁰。可在 Illumina 基因组学计算平台 BaseSpace™ Sequence Hub 中使用 GENIUS Metagenomics 软件。

结果

模拟群落混合物和粪便样本宏基因组学分析

为确定 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 在基本生物鉴定中的准确性和灵敏度，使用 20 个菌株交错混合样本制备了测序文库。使用 One Codex 平台计算宏基因组学分析的汇总指标——真阳性、相对丰度以及假阳性。结果显示了卓越的宏基因组学分析性能：鉴定出了 20 个菌株交错混合物中的全部 20 种生物，没有假阳性（表 2）。20 个菌株交错混合物的组成统计数据也非常准确，全部 20 个物种的实测丰度分值与预期丰度分值非常接近（表 3）。此外，实测丰度分值分布在 4 个数量级，能够检测到样本中低达 0.018% 的物种，证明了 Illumina DNA Prep 测序工作流程具有高灵敏度。

表 2：20 个菌株交错混合物宏基因组学分析汇总统计数据^{a,b}

文库	真阳性	相对丰度	假阳性
20 个菌株交错混合物和 Illumina DNA Prep Library Prep Kit	100%	100%	0

a. One Codex 定义的统计数据如下：**真阳性**：对照中存在的生物体的百分比。如果生物体在真实丰度的 2 个 log 内检测到，则标记为“存在”。**相对丰度**：已知起始生物体丰度和检测到的丰度（基于基因组大小调整的 read 计数）的 Pearson 相关系数。**假阳性**：100% 以下，每个“高”丰度假阳性 10 百分比，每个“中等”丰度 5 分，每个“低”丰度 1 分。“痕量”假阳性不计算分值，最小的可能分值为 0%。

b. 数据集从 2000 万条 read 降至 100 万条 read。

表 3：20 个菌株交错混合物宏基因组学分析组成统计数据

生物体名称	实测丰度	预期丰度
球形红细菌	19.07%	18.00%
大肠杆菌	18.54%	18.00%
表皮葡萄球菌	18.26%	18.00%
牙龈卟啉单胞菌	17.17%	18.00%
变形链球菌	17.61%	18.00%
铜绿假单胞菌	1.93%	1.80%
拜氏梭菌	1.80%	1.80%
蜡样芽胞杆菌	1.15%	1.80%
金黄色葡萄球菌	1.64%	1.80%
无乳链球菌	1.77%	1.80%
鲍曼不动杆菌	0.18%	0.18%
痤疮丙酸杆菌	0.21%	0.18%
脑膜炎奈瑟球菌	0.21%	0.18%
格氏乳杆菌	0.19%	0.18%
幽门螺杆菌	0.19%	0.18%
普通拟杆菌	0.015%	0.018%
粪肠球菌	0.021%	0.018%
耐辐射异常球菌	0.017%	0.018%
青春双歧杆菌	0.013%	0.018%
龋齿放线菌	0.007%	0.018%

检测模拟微生物群落的 Illumina DNA Prep 粗裂解物实验方案与标准实验方案对比。

为比较 Nextera 粗裂解物实验方案和标准实验方案的性能，使用来自 20 个菌株均匀混合全细胞样本的裂解物和提取的 DNA 制备了测序文库。使用粗裂解物和提取的 DNA 制备的文库生成了相同的宏基因组学汇总统计数据（表 4）。

表 4：粗裂解物和提取的 DNA 宏基因组学分析汇总数据比较

文库	真阳性	相对丰度	假阳性
粗裂解物	100%	33%	0
提取的 DNA	100%	32%	0

a. 数据集从 2000 万条 read 降至 500 万条 read。

使用相同的粗裂解物和提取的 DNA 数据集，也比较了从头基因组组装质量，并用 QUAST 计算了组装的基因组分数的比例。总体上，较高的组装的基因组分数表示较高质量的基因组组装。对于所有 20 个分析的生物体，粗裂解物和提取的 DNA 文库产生了非常类似的基因组组装结果（图 3）。

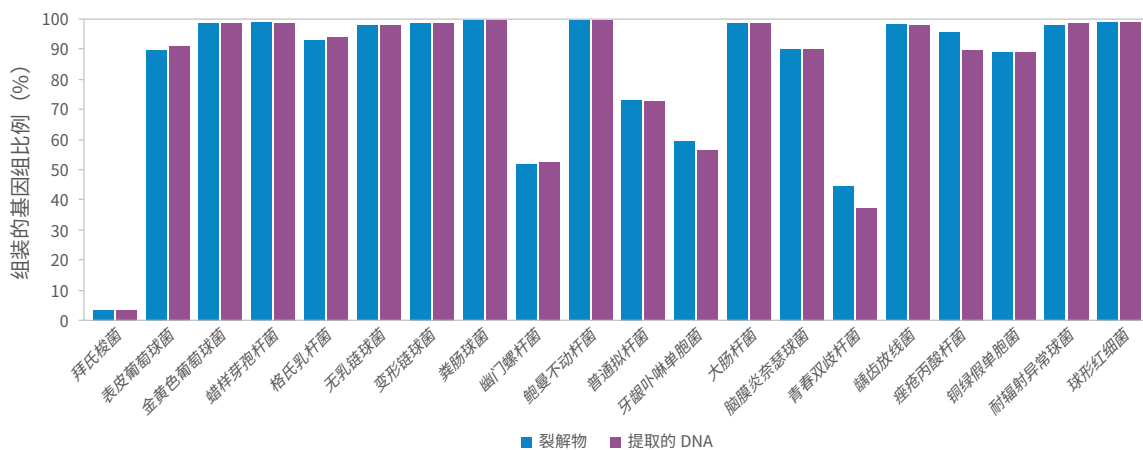


图 3：粗裂解物和提取的 DNA 基因组组装的比较——组装是用 MEGAHIT 使用 500 万条双端 150 bp read 进行的。条形图说明了 QUASt 报告的 20 个生物体的基因组组装性能。

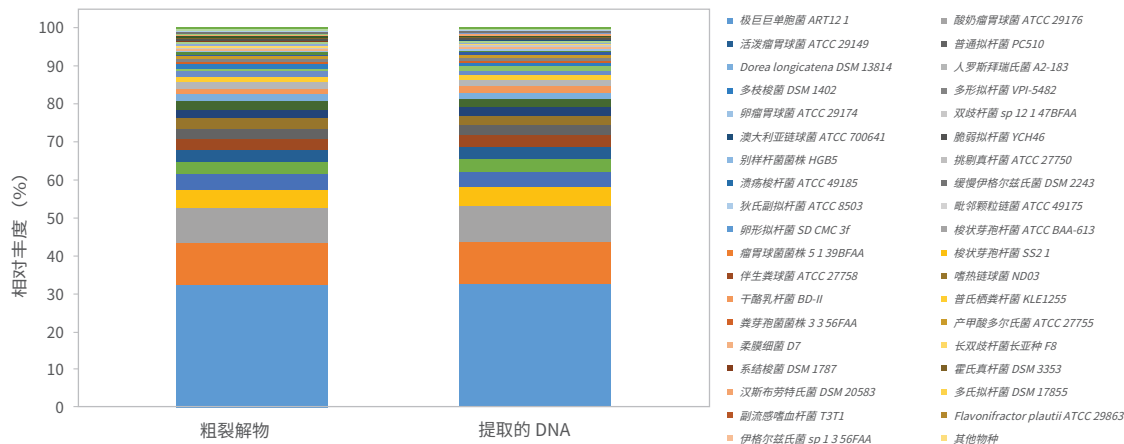


图 4：粗裂解物和提取的 DNA 宏基因组学分析比较——条形图说明了 GENIUS Metagenomics 分析鉴定出的各个生物体的丰度（使用 300 万条双端 150 bp read），两个粪便样本都鉴定出了 60 多种生物体。

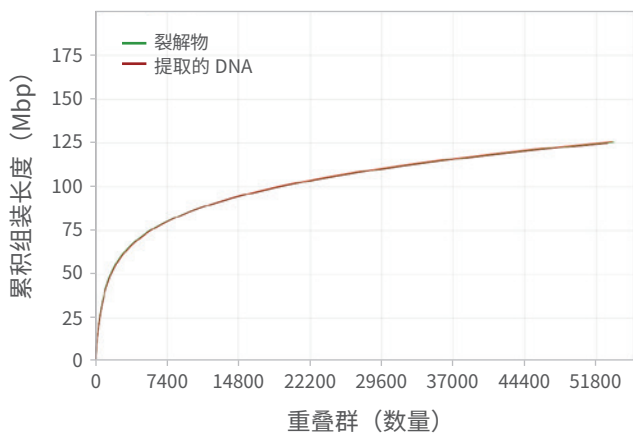


图 5：粗裂解物和提取的 DNA 未知物种基因组组装的比较——图形说明了累积组装长度 (Mbp)，重叠群从大到小排列。使用 2000 万条 read 进行组装。

粪便样本的 Illumina DNA Prep 粗裂解物与标准实验方案对比

即使对于高抑制性样本（如，难度较大的粪便样本），Nextera 粗裂解物实验方案和标准 Illumina DNA Prep 文库制备实验方案产生的宏基因组学分析结果也非常相似（图 4）。与模拟微生物群落样本不同，粪便样本包含未知物种且不知道其比例（各个物种的比例）。对于包含未知物种的宏基因组学样本的从头组装，累积组装长度可用于评估基因组组装质量。使用 QUASt 组装表明，用 Nextera 粗裂解物实验方案和用标准 Illumina DNA Prep 文库制备实验方案从粪便样本制备的文库的累积组装长度非常相似（图 5）。

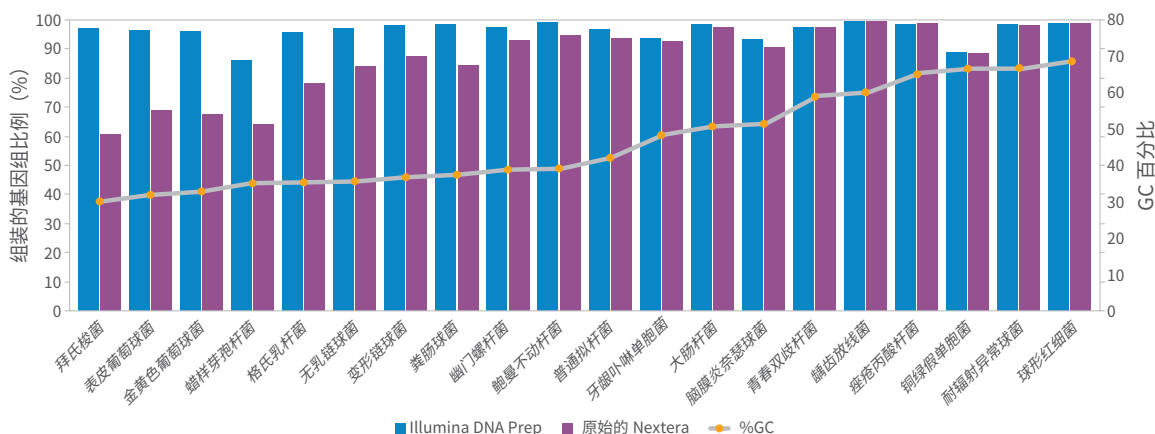


图 6：Illumina DNA Prep 和原始的 Nextera 基因组组装指标的比较——条形图表示全部 20 种生物用 MEGAHIT 组装的基因组分数（使用 200 万条双端 150 bp read）。生物体按 GC 含量升序从左向右排列。

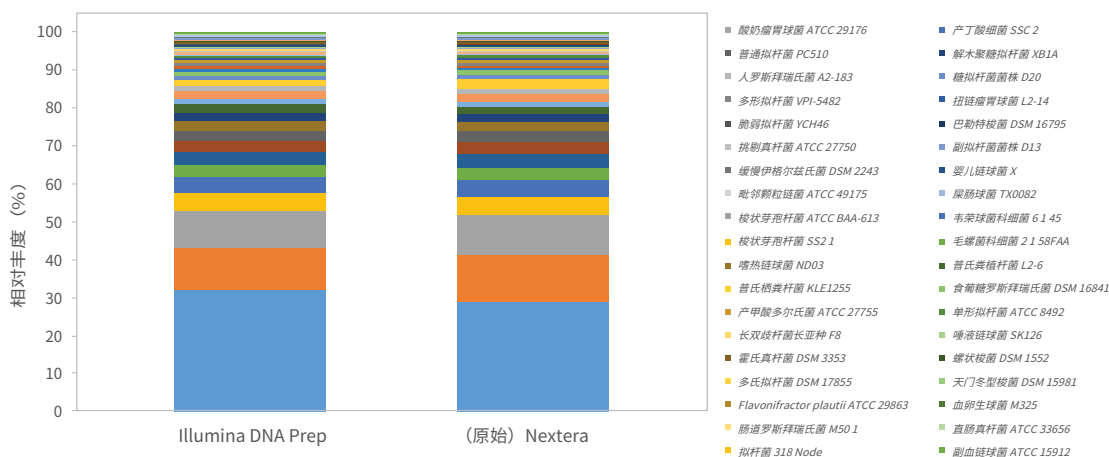


图 7：Illumina DNA Prep 和原始的 Nextera DNA 宏基因组学分析比较——条形图说明了 GENIUS Metagenomics 分析鉴定出的各个生物体的丰度（使用 300 万条双端 150 bp read 进行分析），两个文库都鉴定出了 60 多种生物。

Illumina DNA Prep 在宏基因组学分析方面的性能优于原始的 Nextera DNA Library Prep Kit。

使用从 20 个菌株均匀混合基因组材料和 20 个菌株交错混合基因组材料制备的文库，比较了 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 和原始的 Nextera DNA Library Prep Kit 的分析性能。在 One Codex 平台计算汇总指标，结果表明，Illumina DNA Prep Library Prep Kit 与原始的 Nextera DNA Library Prep Kit 相比，提供更优的宏基因组学分析结果（表 5）。不同于 Nextera DNA 和 Nextera XT Library Prep Kit，Illumina DNA Prep Library Prep Kit 使用先进的 on-bead tagmentation 技术，它提供均一的文库产量、一致的插入片段大小和均一的基因组覆盖。这些优势共同带来了更好的宏基因组学分析性能。

与原始的 Nextera DNA Library Prep Kit 相比，Illumina DNA Prep 可以进行更优的基因组组装。

除了生物体检测和宏基因组学分析评估，也分析了测序数据以比较基因组组装指标。为评估基因组组装质量，用 QUAST 计算了基因组分数组装指标。QUAST 数据表明，对于 20 个菌株均匀混合全细胞材料样本中 20 种生物体的大部分，特别是富含 AT 的生物体，Illumina DNA Prep 性能优于原始的 Nextera DNA Kit（图 6）。

表 5 : Illumina DNA Prep Library Prep Kit 和原始的 Nextera DNA Library Prep Kit 宏基因组学分析汇总数据的比较

	真实性	相对丰度	假阳性
20 个菌株均匀混合基因组材料			
Illumina DNA Prep Library Prep Kit (50 ng)	100%	97%	0
Nextera DNA Library Prep Kit (50 ng)	100%	83%	0
20 个菌株交错混合基因组材料			
Illumina DNA Prep Library Prep Kit (50 ng)	100%	100%	0
Nextera DNA Library Prep Kit (50 ng)	100%	96%	0

为测试 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 与（原始）Nextera DNA Library Prep Kit 相比使用真实宏基因组学样本的性能，从粪便样本制备了粗裂解物和提取的 DNA 文库。这两个文库制备试剂盒产生的宏基因组学分析数据非常相似，说明二者都可提供卓越且类似的分析结果（图 7）。

总结

使用 Nextera 粗裂解物实验方案的 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 可提供快速简便的工作流程，无需昂贵且耗时的 DNA 提取步骤，并可提供卓越的数据质量。与提取的 DNA 相比，Nextera 粗裂解物实验方案为生物体检测和宏基因组学分析提供了高灵敏度和准确度，以及高质量的从头基因组组装性能。由于 Nextera 粗裂解物实验方案支持复杂的宏基因组学混合物例如粪便或模拟微生物群落样本，以及支持唾液、血液和直接细菌菌落的更多演示实验方案，Illumina DNA Prep Library Prep Kit 提供了一种灵活、经济的基于 NGS 的宏基因组学的研究方法。

了解更多

如需了解 Illumina DNA Prep Library Prep Kit 的更多信息，请访问 www.illumina.com/nextera-dna-flex

如需深入了解 Illumina DNA Prep 直接进行细菌菌落测序的相关信息，请下载 www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/nextera-dna-flex-direct-colony-app-note-770-2017-036.pdf

如需深入了解 Illumina DNA Prep 微生物基因组测序的相关信息，请下载 www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/nextera-dna-flex-small-genomes-application-note-770-2017-019.pdf

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。出版号 770-2018-006-A QB5996

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 个双端标签可支持多达 24 个样本，或提供 96 个双端标签可支持多达 96 个样本。**单标签** : 24 个单标签可支持多达 96 个样本。

参考文献

- Ranjan R, Asha RA, Metwally A, McGee HS, Perkins DL. [Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing.](#) *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469:967–977.
- Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. [Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project.](#) *Nature.* 2017;550:61-66.
- Illumina (2016). [Nextera DNA Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
- Illumina (2017). [Illumina DNA Prep Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
- Invitrogen (2015). [PureLink Microbiome DNA Purification Kit User Guide for Microbial Culture.](#) Accessed April 12, 2018.
- Invitrogen (2015). [PureLink Microbiome DNA Purification Kit User Guide for Stool Samples.](#) Accessed April 12, 2018.
- One Codex platform. www.onecodex.com. Accessed April 12, 2018.
- MEGAHIT v1.1.1. github.com/voutcn/MEGAHIT. Accessed April 12, 2018.
- QUAST. quast.sourceforge.net/quast.html. Accessed April 13, 2018.
- GENIUS Metagenomics. www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/cosmosid-genius-metagenomics-know-now.html. Accessed April 12, 2018.



illumina®