

Illumina 用户分享测序样品制备的经验

上一篇说的是 Roche/454 的样品制备,这一次就轮到 Illumina 的用户畅所欲言啦。Ghia Euskirchen 来自耶鲁大学的 Mike Snyder 实验室。高原(音译)来自弗吉尼亚联邦大学。Stephen Kingsmore 是美国国家基因组资源中心的专家。Anoja Perera 来自美国 Stowers 医学研究所。

问题一: 当你分离待测序的目的基因组区域时, 如何确保准确性和重复性?

Ghia Euskirchen: 我们 Solexa (Illumina) 仪器的大部分工作是 ChIP 测序。许多为 ChIP-chip 开发的标准也适用于 ChIP-seq, 抗体验证对所有 ChIP 实验都很关键。我们用 IP-western 以及质谱来验证抗体。对于重复性, 我们会评估三个相同的样品, 并关注对照位点。

高原: 我们大致通过以下几点来检查准确性和重复性: 1. 在目的区域定位读取; 2. 利用 Sanger 测序来验证; 3. 通过重复实验来查看相关性。

Stephen Kingsmore: 国家基因组资源中心目前有两台 Illumina 的测序仪在运行中, 第三台马上也要到了。我们主要有两方面应用: 基因组 DNA 测序和 mRNA 测序。mRNA 步骤是由 Illumina 的 Gary Schroth 小组开发的, 我们一位同事又稍作修改, 而我们的基因组 DNA 步骤是标准的。对于这些样品类型, 我们利用 LIMS 系统来确保准确性和重复性, 它对测序过程中的每个样品进行追踪。另外, 我们还在测序仪和 Infinium HapMap 550K 基因分型芯片上同时运行一套样品, 这有助于我们验证 SNP 检测的准确性。对于核酸变异检测, 我们是利用自己开发的 Alpheus 软件系统 (<http://alpheus.ncgr.org/>)。

Anoja Perera: 到目前为止, 我们只进行过全基因组范围的实验。以后, 如果我们要分离基因组

区域, 我们也会进行验证实验。验证的类型将取决于分离了什么基因组以及分离的技术。如果我们是用长距离 PCR, 那么我们会跑胶验证。我们也可以使用 Sanger 测序来验证扩增区域。

问题二: 如何优化起始 DNA 的量?

高原: 我们曾使用不同的 DNA 起始量来构建文库, 并确定哪个浓度的结果更好。我们发现最重要的优化是起始的文库浓度。我们通常使用 3 pM-4 pM 的 DNA 来产生簇。测量文库浓度的办法有很多。我们是用混合法, 先用 Nanodrop 来测 DNA 的量, 然后和定量 marker 一起跑胶。这两种方法都是高度推荐, 因为这个重要参数会决定你的最终测序结果。

Stephen Kingsmore: 我们会在两个时候优化起始材料的量。一个是 RNA 文库产生的时候, 另一个是生成簇的时候。加入过多或过少的文库都会使序列读取减少。而最佳数量的簇会在每个通道中产生 500 万个读取。我们利用安捷伦的 Bioanalyzer 来确定文库浓度, 一般上样 1 pM-3.5 pM。

Anoja Perera: 对起始 DNA 来说, 数量和质量都很关键。当然, 高效的纯化技术是必不可少的。

问题三: 你采用什么方法来确保样品制备步骤更快速?

Ghia Euskirchen: 我们发现基因组和 ChIP DNA 文库制备相当简单。在文库制备时我们通常会 将样品分开，以避免交叉污染。

高原: Solexa (Illumina) 的样品制备已经足够简单了。我们几乎是按照它的操作步骤来做的。

Stephen Kingsmore: Illumina 的样品制备过程很快速，大约需要一天，而且能同时制备几个文库。这个过程 的瓶颈不在于样品制备，而是簇生成（我们有两台 cluster station 来应对）、序列生成

（特别是产生 46 bp 读长时）、碱基检出和基因组 比对。

Anoja Perera: 提前熟悉一下操作步骤，确保所有的试剂和用品都能用。一定要有备用的。我们就曾试过两次错误扩增，如果没有备用的试剂，我们的实验就会延后。通读操作步骤，划出时间表。基因表达步骤需要三整天，如果准备不充分，你可能还要再多花 8 小时。在等待的时候浏览后续的步骤，了解哪些需要拿出来融化，以便节省时间。

[点击索取Illumina测序仪的详细资料!](#)