

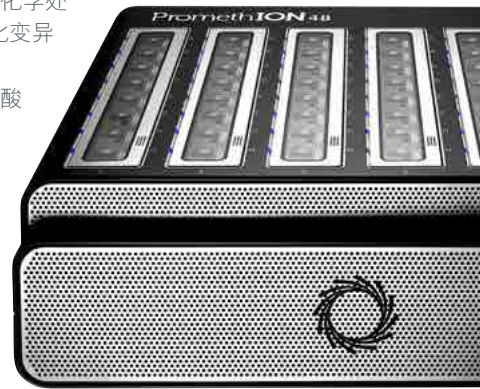
纳米孔测序技术无需进行聚合酶链式反应 (PCR)，即可识别人类基因组中的甲基化

甲基化在调节基因表达方面发挥着重要作用；许多疾病与异常的甲基化模式密切相关，例如癌症和发育障碍。例如，5-甲基胞嘧啶 (5mC) 修饰的核苷酸是一种重要的转录阻遏物，并且介导基因组印记。

使用传统短读长测序技术时，表观遗传修饰会在 PCR 过程中被删除，因此必须通过脱氧核糖核酸 (DNA) 化学处理 (例如亚硫酸氢盐转化) 来推断。然而，转化不完全可能导致该流程得出不同的结果，而且无法区分甲基化变异 5mC 和 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC)。

对天然 DNA 进行无 PCR 纳米孔测序，可在单核苷酸分辨率下直接检测甲基化。该技术可同时在典型核苷酸序列中准确识别碱基修饰，而不再进行额外的样本制备，包括传统测序方法可能无法识别的基因组区域；而且，5mC 和 5hmC 修饰均能得到识别。

在本文中，我们介绍了一种使用 PromethION™ 测序平台，对人类血液样本进行全基因组甲基化识别的简单工作流程。



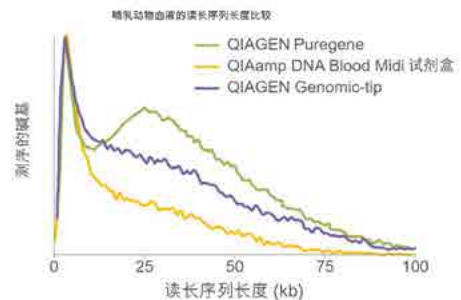
提取：获得高分子量 DNA

依据您的样本类型和实验目的选择最合适 DNA 提取方法。如需从全血中提取 DNA，建议使用 **QIAGEN Puregene Blood 试剂盒***，因为我们发现其测序产量高、长读长序列，如果您打算进行甲基化识别定相，后者尤为重要。



*原名 QIAGEN Genra Puregene Blood 试剂盒

更多类型的样本提取方案建议以及 DNA 存储和污染物处理的指导请参考：
community.nanoporetech.com/docs/prepare



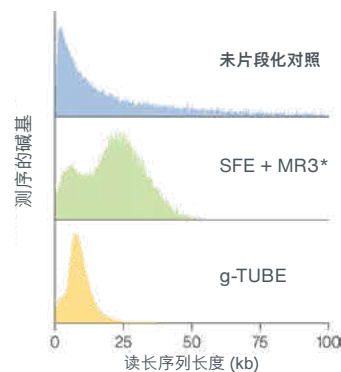
文库制备：方法选择

如无需定相，仅需要识别甲基化，读长序列长度带来的影响很小。因此，建议使用 **Covaris g-TUBE** 对您提取的 DNA 进行打断，获取最长约 10 kb 的 N50 读长序列长度，从而优化文库制备的测序产量。

但是，如果您的目的是对数据定相，以及确定等位基因特异性甲基化，则读长序列长度最大化是关键。为此，建议使用 Oxford Nanopore 的**短片去除扩展 (Short Fragment Eliminator Expansion) 试剂盒**来选择 >10 kb 的片段，并使用 **Diagenode Megaruptor 3** 进行轻微打断，以便获得 ≥20 kb 的 N50 读长序列长度。

建议使用**连接测序试剂盒**制备基因组 DNA。

关于片段大小选择方法的更多信息：
community.nanoporetech.com/extraction_method_groups/size-selection



*Oxford Nanopore 的短片去除扩展 (Short Fragment Eliminator Expansion) 试剂盒 + Diagenode Megaruptor 3

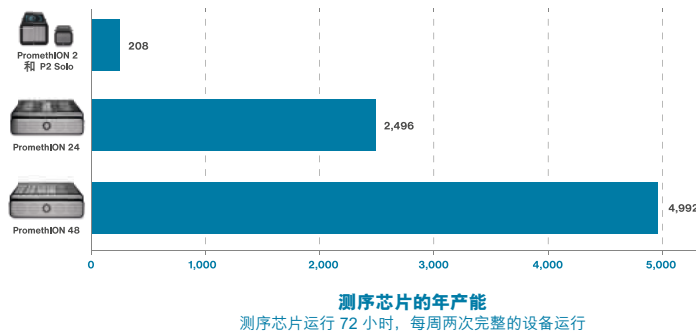
测序: 使用 PromethION 生成高产量的数据

关于测序芯片清洗试剂盒的更多信息:
store.nanoporetech.com/flow-cell-wash

如需对 5mC 和 5hmC 进行全基因组识别, 我们建议将人类基因组测至 20x 测序深度。如需定相数据, 建议测序至略微更高的测序深度 - 约 30x。这些深度均可通过在单张 PromethION 测序芯片上测序单个基因组样本 72 小时来实现。

对于样本处理要求较低的高覆盖度纳米孔测序, 建议使用支持两张 PromethION 测序芯片的 PromethION 2 设备。对于高通量测序项目, 建议使用产能更高的平台 PromethION 24 和 PromethION 48, 它们分别可以同时运行多达 24 和 48 张测序芯片。

使用**测序芯片清洗试剂盒**, 然后每 24 小时加载一次新的文库, 可使通量最大化。



关于 PromethION 的更多信息: nanoporetech.com/products/promethion

分析: 同时识别甲基化和典型碱基

关于数据分析解决方案的更多信息:
nanoporetech.com/data-analysis

在人类基因组中识别 5mC 甲基化时, 若要获得最佳性能, 建议使用 **Remora** 算法。该算法已整合到 MinKNOW™ (纳米孔测序设备的机载软件) 中。Remora 模型将典型碱基的识别与甲基化识别区分开来, 从而在单次运行中实现最高质量的典型碱基识别和甲基化识别, 并最大限度地减少计算费用。

Remora 模型可用于检测 5mC 和 5hmC。您可以访问 GitHub¹ 上的 Remora 存储库, 获取更多进阶用法 (例如, 希望训练自己的模型以检测更多关注的表观遗传修饰)。

如需更深入地分析人类基因组中的变异, 我们建议使用 **wf-human-variation 工作流程**。除了提供甲基化注释和实现单倍型定相外, 此工作流程还可分析单核苷酸变异、拷贝数变异、结构变异和短串联重复序列。此工作流程采用 EPI2ME™ 解决方案, 只需简单点击操作即可运行, 也支持命令行运行。

BAM 输入文件

wf-human-variation
识别变异和甲基化

VCF 和 bedMethyl 输出文件
HTML 报告

更多信息请访问: nanoporetech.com/epigenetics