使用纳米孔长读长序列组装人类基因组

要全面了解人类遗传变异及其对疾病风险的潜在影响，需要获得充分表征的完整基因组。然而，人类基因组中存在大型结构变异 (SV) 和重复序列，使得完整组装颇具难度。

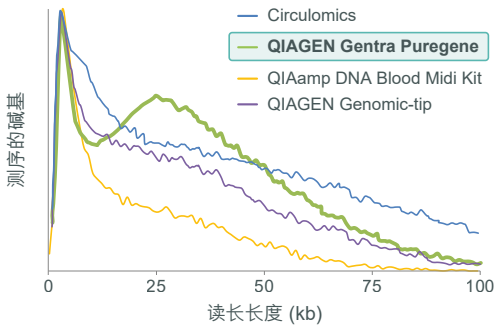
与短读长测序不同，纳米孔测序可生成长片段和超长片段的读长序列，从而增强对结构变异和重复序列的解析能力。利用高通量 PromethION™ 设备，现在可用前所未有的效率获得高度连续的人类基因组测序和组装。

此处展示了一种采用 PromethION 测序平台，对血样中的人类基因组进行组装的简单工作流程。

提取：
获得高分子量 DNA

更多关于各类样本的提取建议，以及 DNA 储存和污染物处理指引：**community.nanoporetech.com/extraction_methods**

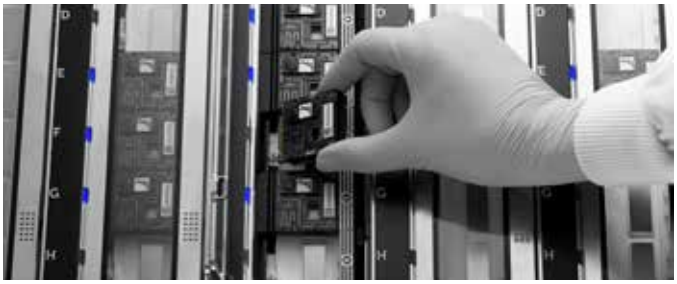
为了获得高分子量 DNA，在选择合适的提取方法时，样本类型是一个重要因素。如需从全血中提取 DNA，建议使用 **QIAGEN Gentra Puregene Blood Kit 试剂盒**，因为我们发现它生成的长读长序列最多。

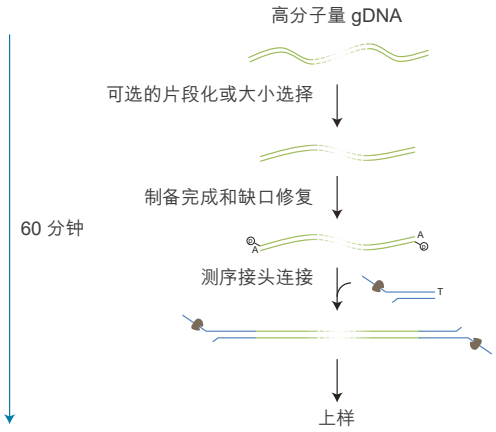


文库制备：
选择试剂盒

更多在长读长测序中使用的片段大小选择方法：**community.nanoporetech.com/extraction_methods**

获得富集的长 gDNA 片段和超长 gDNA 片段 (≥100 kb) 对基因组组装非常重要，其目的是最大限度地增加测序分析所需的重叠序列。提取 gDNA 后，建议对其进行大小选择和轻微剪切，我们发现该操作能增加读长 N50 的长度（建议的读长 N50 目标长度为 25-35 kb）。我们在内部测试中使用 **Circulomics Short Read Eliminator Kit 试剂盒**选择片段大小。选择所有 >10 kb 的片段后，使用 **Diagenode Megaruptor 3** 进行剪切，最终产出结果良好。



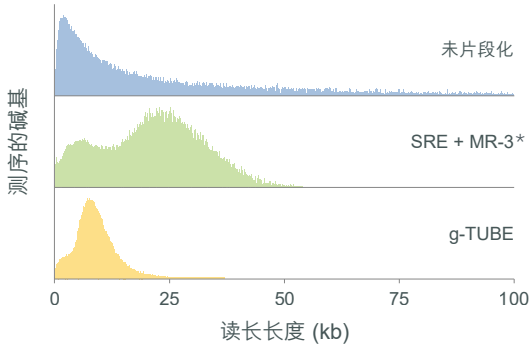


我们建议使用**连接测序试剂盒 (Ligation Sequencing Kit; SQK-LSK109)** 制备测序用 gDNA，该试剂盒可提供最高通量并选择读长长度。

更多样本制备信息（包括快速制备和混样建库选项）：**nanoporetech.com/products/kits**

测序: 使用高产量的 PromethION 生成长读长序列

更多关于 PromethION 的信息:
nanoporetech.com/products/promethion



对于组装，我们建议对每个人类基因组使用 25-35 kb 序列进行测序，最低覆盖深度为 30x；在按上述方案完成提取和文库制备后，使用单个基因组样本，在一个 PromethION 测序芯片上，只需 72 个小时就可以完成一个人类基因组的测序。不过，建议使用 60x 的覆盖深度来测序，以获得最佳组装结果。此外，建议使用高精度模式进行碱基识别。如需达到最高通量，可每 24 小时进行一次核酸酶冲洗并装载新文库。

PromethION 按需测序平台可随时运行多达 24 (P24) 或 48 (P48) 个测序芯片，根据您的测序要求提供最大的灵活度和兼容度。

*Circulomics Short Read Eliminator Kit 试剂盒 + Diagenode Megaruptor 3

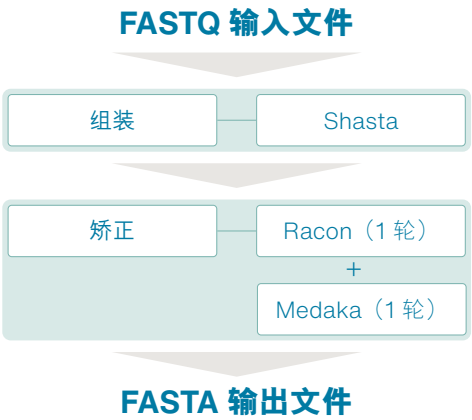
更多关于纳米孔测序服务提供商的信息: **nanoporetech.com/services/providers**

分析: 选择组装工具

更多关于数据分析解决方案的信息:
nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis

我们建议使用第三方工具 Shasta 组装人类基因组，该组装工具可对长读长序列进行快速、准确的基因组组装[1]。通过内部研究，我们发现该工具的运行时间最短，并且可生成最大的 contig N50。另外，我们建议使用 Racon[2] 和 Medaka[3] 各进行一轮组装矫正。这些分析工具均可在 GitHub 上找到。

可使用 PromethION 的机载计算功能进行组装（一个人类基因组的组装需要 1 天左右）；我们还建议使用 Amazon Cloud 实例（亚马逊网络服务）。



更多信息请参见: **nanoporetech.com/investigating/genome-assembly**

Oxford NANOPORE Technologies

微信公众号: nanoporetech
www.nanoporetech.com/cn

参考文献:
1. Shafin, K. *et al.* Efficient *de novo* assembly of eleven human genomes using PromethION sequencing and a novel nanopore toolkit. *BioRxiv*. DOI: https://doi.org/10.1101/715722 (2019).
2. Vaser, R. *et al.* Fast and accurate *de novo* genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Res*. 27(5): 737-746 (2017).
3. © 2020 Oxford Nanopore Technologies Ltd.

Oxford Nanopore Technologies、风轮图标和 PromethION 是 Oxford Nanopore Technologies 在不同国家的注册商标。所有其他品牌和名字隶属于其各自的所有人。© 2020 Oxford Nanopore Technologies.

Oxford Nanopore Technologies 的产品目前仅供研究使用。

WF_1066(CN)_V1_27Apr2020.