

利用 Illumina Complete Long Read Prep, Human 进行全面 的全基因组测序

在高挑战性、难以映射的区域具有出色的表现

illumina®

简介

新一代测序 (NGS) 让科学家们能够破译基因组, 从而更深入地了解生物学。Illumina 成熟的边合成边测序 (SBS) 化学技术与屡获殊荣的 DRAGEN™ 二级分析相结合, 提供超高准确度的全基因组测序 (WGS) 数据。¹即使是一小片段的基因组, 仍可以读取较长的片段长度, 从而针对这些具有挑战性的区域实现更准确的解析和映射。不过, 许多长片段测序解决方案都具有复杂的工作流程、较高的 DNA 输入要求和变化极大的结果。²⁻⁵

Illumina Complete Long Read 简化了长片段测序, 让基因组科学家们能够进行长片段测序。Illumina Complete Long Read Prep, Human 是第一款基于这种新型长片段化学技术的产品。这一高性能的 WGS 实验分析方法采用标准的 NGS 工作流程, 在 NovaSeq™ 6000 系统和 NovaSeq X 系列产品上生成连续的长片段序列 (图 1)。文库制备操作流程十分高效, 一天便可完成, 而且易于扩展, 适用于高通量研究。仅需低至 10 ng 的 DNA 输入量, 无需进行专门的提取、剪切或大小选择。

本技术说明展示了 Illumina Complete Long Read Prep, Human 的卓越性能, 该产品适用于各种 DNA 输入量、DNA 质量和样品类型, 能够为生殖细胞变异分析提供高度准确且全面的 WGS。

方法

从 Genome in a Bottle (GIAB) 联盟获取参考样品 HG002/NA24385, 作为纯化的基因组 DNA (gDNA)。分别获取血液和唾液样本, 并使用市售的常规或高分子量提取试剂盒, 按照制造商的说明提取 gDNA。

文库制备

使用 Illumina Complete Long Read Prep, Human (Illumina, 商品目录号 20089108), 从不同数量的输入 gDNA 制备“地标”文库。简而言之, 就是为长的单分子 DNA 片段酶标记上独特的图案 (地标)。使用 Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina, 商品目录号 20041794) 制备未标记文库, 这些文库用于在分析中生成代表原始单分子片段的长连续片段。

测序

在 NovaSeq 6000 系统上分别对“地标”和未标记文库以 2×150 bp 的片段长度执行运行进行测序。

数据分析

使用 Illumina Complete Long Read WGS 应用程序在 BaseSpace™ Sequence Hub 上进行“地标”片段的组装和渲染。使用 Interactive Genomics Viewer (IGV) 进行数据分析和可视化。



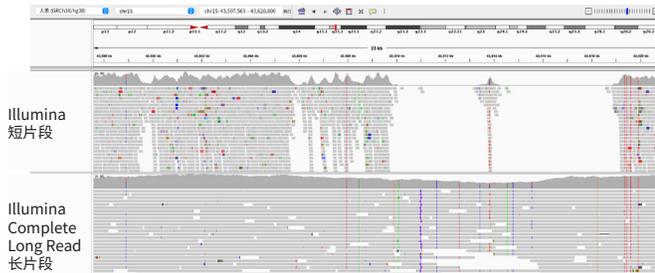
图 1: Illumina Complete Long Read Prep, Human 工作流程 — Illumina Complete Long Read Prep, Human 提供精简的工作流程, 包括四个步骤: DNA 提取、文库制备、测序和数据分析。

a. 虽然输入可以低至 10 ng, 但 Illumina 建议使用 50 ng 的 DNA

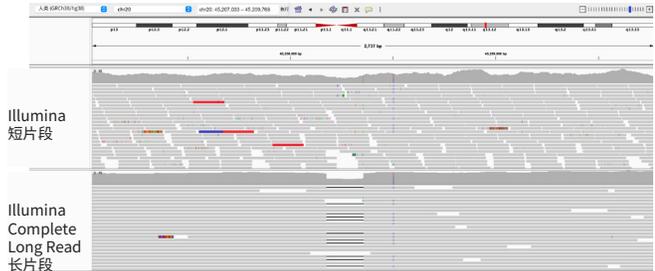
在高难度区域提供高质量数据

ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 覆盖了无法明确映射短片段的区域。这让那些因为仅有片段而已知具有映射问题的疾病相关基因和假基因进行连续测序成为可能，此类基因包括 *STRC* (图 2A)、*SEMG1* (图 2B) 和 *SULT1A1* (图 2C)。

A. STRC 基因



B. SEMG1 基因



C. SULT1A1 基因



图 2：全面的覆盖支持在高难度的区域准确检测多种变异类型 — ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 能够在高难度基因组区域对包括 (A) *STRC*、(B) *SEMG1* 和 (C) *SULT1A1* 在内的疾病相关基因进行准确的测序。

此外，ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 提供的定相块明显大于一般的基因大小。这使得整个人类白细胞抗原 (HLA) 位点的均匀覆盖成为可能，该位点是一个密集多态性区域，具有高水平的序列同源性、假基因、变异性和大量等位基因。虽然难以准确测序，但 ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 提供了整个 HLA 区域的均匀覆盖，并使基因组定相能够清晰地显示母系和父系染色体上的等位基因并加以区分 (图 3)。

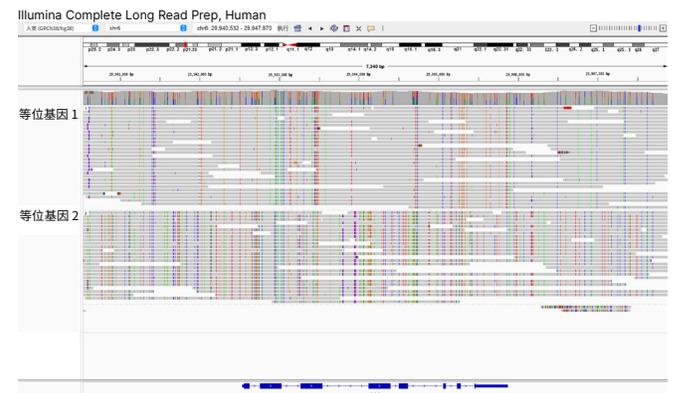


图 3：均匀的覆盖实现清晰的单体型定相 — ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 提供 HLA 区域的全面覆盖，能够对 HLA 区域内的等位基因进行清晰准确的定相。

为了更全面地评估变异检出准确性，在 PrecisionFDA Truth Challenge V2 中，将 ILLUMINA LONG READ PREP, HUMAN 与第三方长片段平台以及 ILLUMINA 短片段进行了比较。此项挑战由 PrecisionFDA、GIAB 和美国国家标准与技术研究院 (NIST) 赞助，旨在在共同的参考框架上评估小型变异检出管道性能，其中重点关注的是“难以映射”的区域。使用此数据集，ILLUMINA COMPLETE LONG READ PREP, HUMAN 表现出卓越的准确性，并以 99.87% 的 F1 分数优于替代的长片段平台 (图 4)。

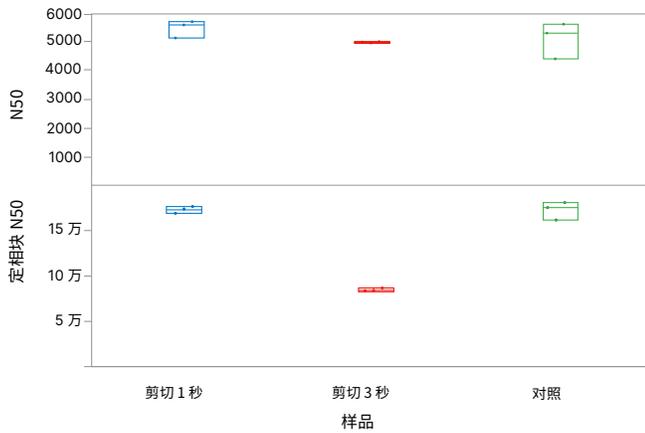


图 7: 剪切过的 DNA 的测序指标 — 将剪切了 1 和 3 秒钟的 DNA 用作 Illumina Complete Long Read Prep, Human 的输入。产生的文库生成了高质量的长片段测序数据 (以 N50 和定相块 N50 衡量)。

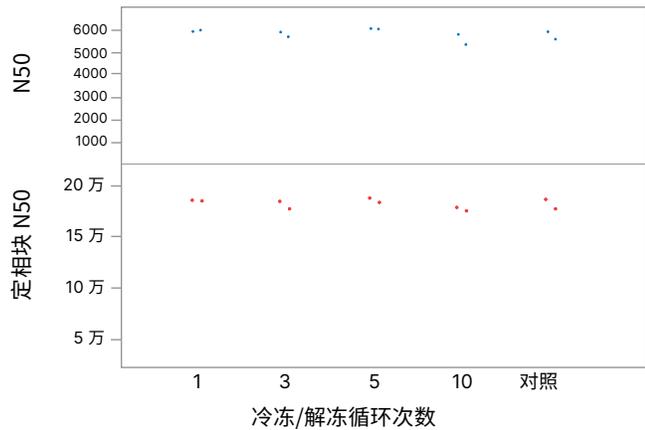


图 8: 经过冷冻和解冻的 DNA 的测序指标 — 将经过 1、3、5 和 10 次冷冻和解冻循环的 DNA 用作 Illumina Complete Long Read Prep, Human 的输入。产生的文库生成了高质量的长片段测序数据 (以 N50 和定相块 N50 衡量)。

灵活支持各种样品类型

Illumina Complete Long Read Prep, Human 支持各种样品类型, 包括血液和唾液。使用标准或高分子量 (HMW) 试剂盒进行提取后, 使用 Fragment Analyzer 对 DNA 质量进行了评估 (图 9)。测序结果表明, 来自血液和唾液的 DNA 生成了高质量的数据 (图 10)。值得注意的是, 用标准试剂盒和 HMW 试剂盒提取的 DNA 在性能上没有差异 (图 10)。

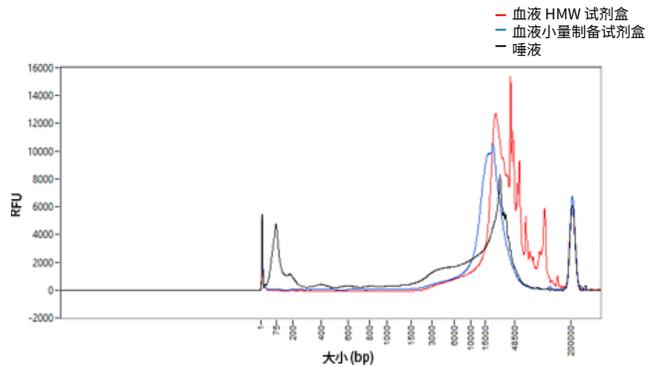


图 9: 血液和唾液 DNA 质量 — 在 Fragment Analyzer 上对从血液 (HMW、小量) 或唾液中提取的 DNA 进行了分析。

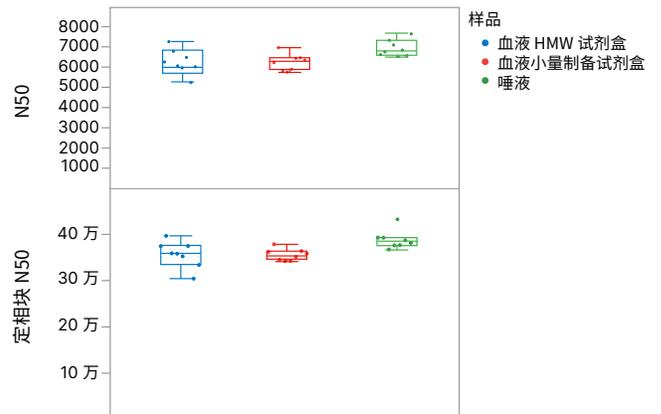


图 10: 适用于不同样品类型的高质量性能 — 由血液 (HMW、小量) 和唾液生成的 Illumina Complete Long Read Prep, Human 文库提供高质量的数据 (以 N50 和定相块 N50 衡量)。

总结

长片段测序化学技术针对短片段 NGS 难以解决的基因组区域提供了额外的信息。Illumina Complete Long Read 让基因组科学家们能够使用长片段测序，并对长片段测序进行了简化。Illumina Complete Long Read Prep, Human 是第一款基于这种新型化学技术的产品，它提供简化、熟悉的工作流程，并与成熟的 Illumina SBS 化学反应和 DRAGEN 分析相协同。这一高度创新的化学技术支持在同一台仪器上执行短片段和长片段测序，让基因组实验室能够使用长片段 NGS。Illumina Complete Long Read Prep, Human 对来自不同样品来源的不同数量和质量 DNA 都表现出强大的性能。因此，这是一个高度可扩展且准确的人类 WGS 解决方案。

了解详情

[Illumina Complete Long Read Prep, Human](#)

参考资料

1. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN Wins at Precision- FDA Truth Challenge V2 Showcase Accuracy Gains from Alt-aware Mapping and Graph Reference Genomes. illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html. 2023 年 1 月 12 日查阅。
2. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf. 2022 年发布。2023 年 1 月 12 日查阅。
3. Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf. 2022 年发布。2023 年 1 月 12 日查阅。
4. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html. 2023 年 1 月 12 日查阅。
5. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf. 2018 年发布。2023 年 1 月 12 日查阅。



1.800.809.4566 (美国免费电话) | +1.858.202.4566 (电话)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Illumina, Inc. 或其各自所有者的财产。有关特定的商标信息，请参见 www.illumina.com/company/legal.html。
M-GL-01421 CHS v1.0