

使用 Oxford Nanopore 组装高质量植物基因组

高质量的植物基因组组装对于推动研究和农业生物技术的发展而言至关重要，该技术不仅有助于研究生物多样性以制定保护策略，还能对作物进行精细表征和改良以实现可持续生产力。然而，植物基因组往往规模庞大、结构复杂且高度重复，这使得用传统短读长测序技术进行基因组组装困难重重。此外，使用 PCR 无法捕获不易扩增的序列，而表观遗传修饰则必须通过化学处理（如重亚硫酸盐转化）进行间接检测。

使用读长长度不受限制（从短到超长）的纳米孔测序技术，现在可以通过简单、高效的流程进行高质量的植物基因组组装。纳米孔长读长测序技术能够覆盖大型重复序列或高度均一的序列及结构变异，且对天然 DNA 进行测序可捕获 PCR 无法获得的序列。也可以在同一次测序运行中同时检测规范碱基序列和表观遗传修饰，从而通过单一数据集提供多组学见解。高产量 PromethION 设备具备灵活多样的性能，使实验室能够根据项目规模、样本量和预算调整测序能力，为多样化的测序需求提供量身定制的解决方案。



本工作流程介绍了如何通过 **PromethION** 设备进行纳米孔测序，用植物叶片样本生成高质量基因组组装。

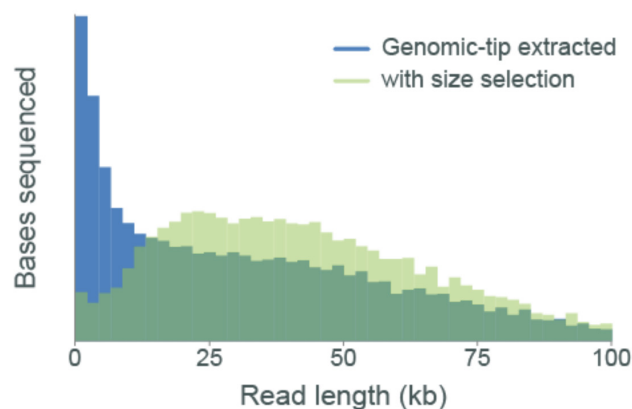
提取： 获取高分子量 DNA

为了将纳米孔测序中的长读长序列产量最大化，请务必提取高质量、高分子量的 DNA 样本。我们建议使用基于 **Carlson 裂解缓冲液** 的方案从植物叶片样本中提取 DNA，然后使用 **QIAGEN Genomic-tip 500/G** 进行纯化。

片段大小筛选并非样本制备过程中的必要步骤，但可以用于提高测序中的读长 N50 值。如果起始样本量充足，我们建议采用提取方案中可选的片段大小筛选步骤，选择长度超过 10 kb 的片段。

处理由较短片段组成的降解样本时，可以省略片段大小筛选步骤，从而确保有足够的输入材料以进行文库制备。

查看提取方案：
nanoporetech.com/fever-tree-extraction

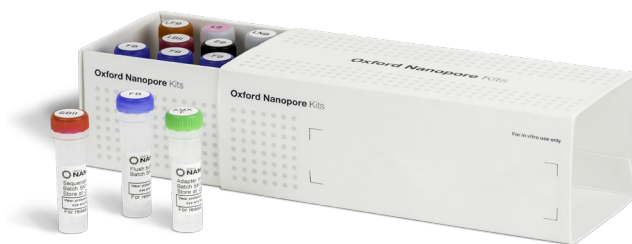


文库制备： 无需 PCR 生成测序文库

我们建议使用**连接测序试剂盒**进行文库制备。这种无需 PCR 的方法能够保留天然 DNA 的长片段，确保在测序中捕获那些难以扩增的区域，同时保留表观遗传修饰。

连接测序试剂盒经过优化，可实现高准确性和高产量，确保对植物基因组的良好覆盖深度。将提取的 DNA 制备为可用于测序的文库只需大约一小时。

了解有关制备 DNA 文库的更多信息：
nanoporetech.com/prepare-dna



测序: 使用 PromethION 设备根据需求调整产量

PromethION™ 系列纳米孔测序设备为按需、高产量的全基因组测序提供了理想的解决方案。PromethION 24 支持对多达 24 个可单独寻址的测序芯片进行测序，且具备强大的板载计算能力。对于较小的项目，PromethION 2 设备能够在最多两个测序芯片上同时或独立运行，为任何实验室提供 PromethION 水平的测序能力。

为了获得最佳组装指标，我们建议生成足够的测序数据，确保对单倍体或二倍体植物基因组的最低覆盖深度为 30 X。对于具有更高倍性的基因组，每增加一个倍性，最低覆盖深度应额外增加 15 X。我们建议使用超高精度 (SUP) 碱基识别模式以获得最高质量的读长序列。此外，可以在碱基识别阶段启用 5mC 和 6mA 修饰碱基检测，以捕获甲基化信息进行后续分析。这不会影响组装流程，但可以提供额外的表观遗传学见解。

了解更多有关 PromethION 系列设备的信息：
nanoporetech.com/promethion



分析: 构建高质量的植物基因组组装

在进行基因组组装之前，我们建议使用 **SeqKit**^{1, 2} 过滤质量分数超过 10 的读长。对于组装，我们推荐使用 **hifiasm**^{3,4,5} (v0.24.0 或更高版本) 组装工具，并采用针对使用 Oxford Nanopore 读长的单倍型组装进行过优化的设置（通过 “--ont” 标志启用）。该组装工具在输入 FASTQ 文件后，生成一个呈现所有等位基因的 n 倍体组装，但单个 contig 可能包含来自多个单倍型的等位基因。

如果是处理降解的植物样本且生成的读长 N50 值低于 10 kb，则推荐使用 **Flye**⁶ 组装工具，因为它在各种种属和数据集中的表现都非常稳定。Flye 接受将 FASTQ 或 FASTA 文件作为输入，并生成单倍型合并的组装，但在高度杂合的基因组中，对倍性的处理可能有所局限。

了解更多有关分析纳米孔测序数据的信息，请访问：
nanoporetech.com/analyse

对于矫正，我们建议运行 **Medaka** 作为可选步骤。研究表明在许多情况下，通过 Medaka 进行一轮校正可以提高共识准确性，从而提升整体组装质量。



了解更多信息，请访问: nanoporetech.com/plant-research



oxford nanopore technologies
微信公众号: **NanoporeTechnologies**
<https://www.nanoporetech.net/>

参考文献:

- Shen, W., Sipos, B., and Zhao, L. *iMeta* 3:e191 (2024). DOI: <https://doi.org/10.1002/imt.2191>
- Shen, W. et al. *PLOS ONE* 11(10):e0163962 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>
- Cheng, H. et al. *Nat. Methods* 18:170–175 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01056-5>
- Cheng, H. et al. *Nat. Biotechnol.* 40:1332–1335 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01261-x>
- Cheng, H. et al. *Nat. Methods* 21:967–970 (2024). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02269-8>
- Kolmogorov, M. et al. *Nat. Biotechnol.* 37:540–546 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>

出版时信息准确无误。可能会发生变更。

Oxford Nanopore Technologies、风车图标和 PromethION 是 Oxford Nanopore Technologies plc 在多个国家的注册商标。本文所含信息可能受 Oxford Nanopore Technologies plc 的专利或正在申请的专利保护。© 2024 Oxford Nanopore Technologies plc. 版权所有。Oxford Nanopore Technologies 产品并非旨在用于健康评估或诊断、治疗、缓解、治愈或预防任何疾病或健康问题。

WF_1281(CN)_V1_20Dec2024