

目录

6 简介

7 序列重排

- 8 RAD 和 PE RAD-Seq:限制性酶切位点关联的 DNA 测序
- 11 ddRADseq:双重消化限制性酶切位点关联的 DNA 标记生成
- 13 2b-RAD:基于 IIB 型限制性内切酶的 RAD
- 14 SLAF-seq:特异性位点扩增片段测序
- 16 hyRAD:降解 DNA 的杂交 RAD
- 17 Rapture:限制性酶切位点关联的 DNA 捕获技术
- 18 Digenome-seq:Cas9 酶消化全基因组测序
- 19 CAP-seq:CXXC 亲和纯化测序
- 20 CPT-seq:能保留邻近序列信息的转座子酶测序
- 21 RC-Seq:反转录转座子捕获测序
- 22 Tn-Seq:转座子测序、INSeq:插入测序
- 24 TC-Seq:易位捕获测序
- 25 Rep-Seq:组库测序、Ig-seq:免疫球蛋白基因的 DNA 测序、MAF:分子扩增指纹图谱分析
- 26 EC-seq:切除环测序
- 27 Bubble-Seq:含复制起始位点(复制泡)的限制性片段文库
- 28 NSCR:新生链捕获和释放
- 29 Repli-Seq:新生 DNA 复制链测序
- 30 NS-Seq:新生链测序

31 DNA 断裂定位

- 32 定位 DNA 单链断裂(SSB-Seq)
- 33 BLESS:通过链霉亲和素标记和富集断裂片段并测序
- 34 DSB-Seq:定位 DNA 双链断裂
- 35 Break-seq:双链断裂标记
- 36 GUIDE-seq:基于测序的基因组水平无偏向性 DSB 鉴定
- 38 HTGTS:高通量全基因组易位测序
- 39 LAM-HTGTS:线性扩增介导的高通量基因组范围测序

40 低水平 DNA 检测

- 41 smMIP:单分子分子倒置探针
- 43 MIPSTR:基于 smMIP 的 STR 位点靶向捕获
- 44 MDA:多重置换扩增技术
- 46 MIDAS:微孔置换扩增系统、IMS-MDA:MDA 靶向细菌富集的免疫磁珠分离法、ddMDA:数字微滴式 MDA

- 48 MALBAC:多次退火环状循环扩增技术
- 50 nuc-seq:S 期细胞的单个 G2/M 期细胞核测序、SNES:单细胞核外显子组测序
- 52 OS-Seq:寡核苷酸选择性测序
- 53 Safe-SeqS:Safe 测序系统是一种用于检测稀有突变的独特分子标识符 (UMI) 方法。
- 55 Duplex-Seq:双重测序
- 57 DR-Seq:DNA-mRNA 测序
- 58 G&T-Seq:基因组和转录组测序
- 59 scM&T-Seq:单细胞甲基化和转录组测序
- 60 scTrio-seq:单细胞三重组学测序
- 61 scBS-Seq:单细胞亚硫酸氢盐测序
- 62 scAba-seq:使用 AbaSI 核酸酶检测单细胞中的 5hmC 标记
- 63 单细胞 RC-Seq:单细胞反转录转座子捕获测序
- 64 scATAC-Seq (细胞标签变型):转座酶可及性染色质的单细胞检测
- 65 scATAC-Seq (微流体变型):转座酶可及性染色质的单细胞检测
- 66 Drop-ChIP 或 scChIP-seq:基于微滴的单细胞染色质免疫沉淀测序
- 67 SMDB:单分子微滴条形码标记

68 表观遗传学

- 70 BS-Seq、Bisulfite-seq 和 WGBS:全基因组亚硫酸氢盐测序 (WGBS)
- 72 PBAT:亚硫酸氢盐处理后加接头标记
- 73 BSPP:基于锁式探针的亚硫酸氢盐测序
- 74 RRBS-Seq:简化代表性亚硫酸氢盐测序
- 76 BSAS:亚硫酸氢盐扩增子测序
- 77 MRE-Seq 和 Methyl-Seq:甲基化敏感性限制酶测序
- 78 EpiRADseq:基于甲基化敏感性限制酶的双重消化限制性位点相关 DNA 标记生成
- 79 T-WGBS:基于标签片段化的全基因组亚硫酸氢盐测序
- 80 JBP1-seq:J 结合蛋白 1 测序
- 81 ABA-seq:AbaSI 联用测序
- 82 TAmC-Seq:Tet 辅助性 5- 甲基胞嘧啶测序
- 83 fC-Seal:5- 甲酰胞嘧啶选择性化学标记
- 84 fC-CET:5fC 化学标记和 PCR 过程中的 C 到 T 转换
- 85 CAB-Seq:化学修饰辅助性亚硫酸氢盐测序
- 86 oxBS-Seq:氧化式亚硫酸氢盐测序
- 88 redBS-Seq:还原式亚硫酸氢盐测序、caMAB-seq:5- 羧基胞嘧啶甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序
- 89 fCAB-seq:5- 甲酰胞嘧啶化学修饰辅助性亚硫酸氢盐测序
- 90 MAB-seq:M.SssI 甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序
- 91 RRMAB-seq:简化代表性 M.SssI 甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序
- 92 TAB-Seq:Tet 辅助性亚硫酸氢盐测序
- 94 MIRA:甲基化 CpG 岛回收分析 (MIRA)

- 95 MeDIP-Seq: 甲基化 DNA 免疫沉淀、DIP-seq: DNA 免疫沉淀后进行高通量测序
- 97 hMeDIP-seq: 羟甲基化 DNA 免疫沉淀和测序
- 99 MBDCap-seq: 基于甲基化 CpG 结合域 (MBD) 的捕获和测序、MethylCap-Seq: 使用 MeCP2 的甲基化 CpG 结合域 MBD 来捕获甲基化 DNA、MiGS: 甲基化 CpG 结合域分离的基因组测序
- 101 BisChIP-seq: 经亚硫酸氢盐处理的染色质免疫沉淀 DNA 测序、ChIP-BS-seq: 经亚硫酸氢盐处理的染色质的 ChIP- 亚硫酸氢盐测序、ChIP-BMS: 染色质免疫沉淀结合亚硫酸氢盐甲基化测序分析

103 DNA- 蛋白质相互作用

- 104 ChIP-Seq: 染色质免疫沉淀测序、HT-ChIP: 高通量 ChIP、ChIP-exo: 核酸外切酶剪切 ChIP、Mint-ChIP: 多重 ChIP
- 106 DNaseI Seq 或 DNase-Seq: DNase I 超敏位点测序
- 108 DNase I SIM: DNase I 简化的植物核内方法
- 109 MNase-Seq: 微球菌核酸酶测序、MAINE-Seq: 微球菌核酸酶辅助性核小体分离、Nucleo-Seq: 分离核小体测序、Nuc-seq: 分离核小体测序
- 111 FiT-Seq: 固定组织的染色质免疫沉淀测序
- 112 PAT-ChIP: 病理学组织的染色质免疫沉淀
- 113 X-ChIP-seq: 高分辨率交联染色质免疫沉淀测序
- 114 ORGANIC: 亲和纯化获得的天然分离染色质基因组中被占据的区域
- 115 ATAC-Seq: 转座酶可及性染色质测序、Fast-ATAC: 针对血细胞优化的 ATAC-seq
- 118 THS-seq: 转座体超敏位点测序
- 119 CATCH-IT: 共价连接标签以捕获组蛋白和鉴定周转
- 120 MINCE-seq: 利用 EdU 体内定位新生染色质
- 121 FAIRE-seq: 甲醛辅助性调控元件分离、Sono-Seq: 超声处理交联染色质测序
- 123 NOMe-Seq: 核小体占位甲基化组测序
- 124 ChIPmentation: 染色质免疫沉淀结合基于 Tn5 转座酶的测序文库制备
- 125 ChIA-PET: 基于双端标记测序的染色质相互作用分析
- 127 3-C、Capture-C 和 Hi-C: 染色质构象捕获测序
- 129 NG Capture-C: 新一代 Capture-C
- 130 4C-seq: 环状染色质构象捕获
- 132 UMI-4C: 环状染色质构象捕获结合唯一分子标识
- 133 5C: 染色质构象捕获碳拷贝
- 134 Pu-seq: 聚合酶测序
- 135 PB-seq: 蛋白质 /DNA 结合后进行高通量测序
- 136 SELEX 或 SELEX-seq: 指数富集的配体系统进化技术、HT-SELEX: 高通量配体指数富集的系统进化技术
- 138 HiTS-FLIP: 高通量测序结合荧光配体相互作用分析
- 139 DamID: DNA 腺嘌呤甲基转移酶相互作用检测
- 141 MPE-seq: 甲铵丙基乙二胺四乙酸 (EDTA) 测序
- 142 Chem-seq: 基于小分子化合物的位点结合识别测序

简介

本出版物是针对 DNA 测序的新一代测序（NGS）方法合集，汇编自科学文献。谨以此合集向使用人员的创新及该技术方法的多功能性致敬。我们希望它能够启发研究人员对这些方法加以利用或开发新方法，以解决新的科研难题。

本合集所称的方法指的是提取核酸（样本制备）与添加测序所需寡核苷酸接头（文库制备）之间的处理步骤。该技术仅需额外增加若干处理步骤，即可解决多种科研问题。

使用本文档时，请注意以下几点：

- 新方法仍在不断开发中。如需获取最新的方法列表，请访问：www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer.html
- 仅提供近期发表的参考文献（通常为过去 2 年间）。
- 除极少数例外，方法名中的大写、破折号和特殊字符均与原始引用文献中的完全相同。这一点非常重要，原因是诸如 CapSeq¹ 和 CAP-seq² 等方法的区分相当大，其分别属于 RNA 方法和 DNA 方法。
- 方法按相似性排序，因此类似方法的位置相近。要进行直观的方法比较，请参阅 <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/applications/ngs-library-prep/ForAllYouSeqMethods.pdf>
- 如果某些方法的本质相同，并且可通过同一图表展示，则会将这些方法组合，例如 GRO-seq³ 和 BRIC-Seq。⁴
- 所述图表为示意图。可能未包含目标方法的所有细节信息。
- 上述方法均由使用者开发，因此如需详细说明和实验方案，读者应参阅原文献。

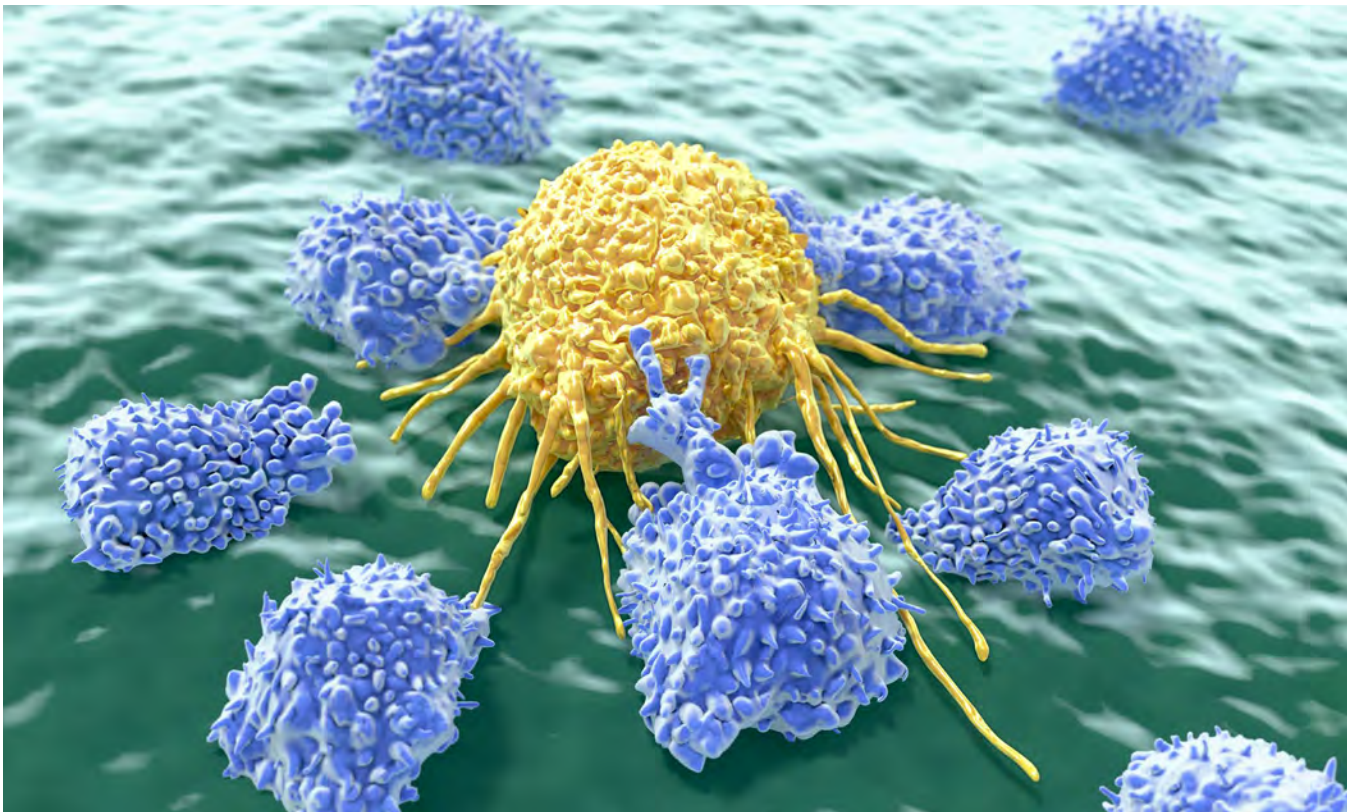
如有遗漏，请联系我们添加您所认为需要列出的实验方案。

1. Gu W., Lee H. C., Chaves D., et al. CapSeq and CIP-TAP identify Pol II start sites and reveal capped small RNAs as *C. elegans* piRNA precursors. *Cell*. 2012;151:1488-1500.
2. Illingworth R. S., Botting C. H., Grimes G. R., Bickmore W. A. and Eskeland R. PRC1 and PRC2 are not required for targeting of H2A.Z to developmental genes in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7:e34848.
3. Core L. J., Waterfall J. J. and Lis J. T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science*. 2008;322:1845-1848.
4. Tani H., Mizutani R., Salam K. A., et al. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res*. 2012;22:947-956.

序列重排

越来越多的证据表明健康个体的体细胞基因组重排（例如，反转录转座和拷贝数变异（CNV））较为常见。^{5,6,7} 癌症基因组也存在大量复杂的重排现象⁸。尽管常规 NGS 即可检出上述大部分重排，但针对转座因子等重排的研究也有许多专用方法。

基因转座因子（TE）包括各种能够通过剪切-粘贴机制（转座子）或经 RNA 间接介导（反转录转座子）在基因组中从一个位置转移至另一个位置的 DNA 序列。⁹ TE 在人类基因组中约占 66–69%，¹⁰ 并且在衰老、癌症、脑功能、发育、胚胎形成以及群体和进化的表型变异中发挥着重要作用。¹¹ 在 TE 引发序列重排的同时，染色体和着丝粒上的重排还可能导致多种疾病和功能紊乱。¹²



体细胞中的基因组重排会导致癌变。

5. O'Huallachain M., Weissman S. M. and Snyder M. P. The variable somatic genome. *Cell Cycle*. 2013;12:5-6.
6. Macosko E. Z. and McCarroll S. A. Genetics. Our fallen genomes. *Science*. 2013;342:564-565.
7. McConnell M. J., Lindberg M. R., Brennand K. J., et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science*. 2013;342:632-637.
8. Malhotra A., Lindberg M., Faust G. G., et al. Breakpoint profiling of 64 cancer genomes reveals numerous complex rearrangements spawned by homology-independent mechanisms. *Genome Res*. 2013;23:762-776.
9. Fedoroff N. V. Presidential address. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*. 2012;338:758-767.
10. Grandi F. C. and An W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites: Partners in genomic variation. *Mob Genet Elements*. 2013;3:e25674.
11. Gschwend A. R., Weingartner L. A., Moore R. C. and Ming R. The sex-specific region of sex chromosomes in animals and plants. *Chromosome Res*. 2012;20:57-69.
12. Chiarle R. Translocations in normal B cells and cancers: insights from new technical approaches. *Adv Immunol*. 2013;117:39-71.

RAD 和 PE RAD-Seq: 限制性酶切位点关联的 DNA 测序

RAD-seq 方案适用于基因分型和发现单核苷酸多态性 (SNP)¹³。该方法尤其适用于在无参考基因组的情况下进行基因分型, 例如生态学研究¹⁴。PE RAD-seq (或称 RAD-PE) 与 RAD 是相同的方案, 只不过采用了双端测序以提升比对效果¹⁵。目前已开发出 ddRADseq¹⁶、2b-RAD¹⁷、SLAF-seq¹⁸ 和 hyRAD¹⁹ 等多种不同方案来解决具体的应用问题, 并提供有多种软件包用以分析 RAD 数据^{20,21}。

在该方法中, 先用限制性酶消化基因组 DNA (gDNA), 然后将带有条形码的 P1 接头连接到片段上。将来自不同样本带接头的片段混合 (如果要进行多样本测序), 然后剪切 DNA。根据片段大小进行选择, 然后纯化。连接 P2 接头 - 引物, 然后扩增片段以生成测序文库。



RAD-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需参考基因组²²• 价格低于全基因组测序• 可通过选择不同的限制性酶和片段大小调整基因组覆盖度 | <ul style="list-style-type: none">• 基因组覆盖可能存在空缺区域• 需要使用高质量 DNA (请参阅适用于低质量 DNA 的 hyRAD²³)• DNA 限制性酶切位点的序列多态性会导致不同进化枝间共同的限制性位点逐渐丢失²⁴ |

13. Baird N. A., Etter P. D., Atwood T. S., et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One*. 2008;3:e3376.
14. Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet*. 2016;17:81-92.
15. Willing E. M., Hoffmann M., Klein J. D., Weigel D. and Dreyer C. Paired-end RAD-seq for de novo assembly and marker design without available reference. *Bioinformatics*. 2011;27:2187-2193.
16. Peterson B. K., Weber J. N., Kay E. H., Fisher H. S. and Hoekstra H. E. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One*. 2012;7:e37135.
17. Wang S., Meyer E., McKay J. K. and Matz M. V. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nat Methods*. 2012;9:808-810.
18. Sun X., Liu D., Zhang X., et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One*. 2013;8:e58700.
19. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One*. 2016;11:e0151651.
20. Fan W., Zong J., Luo Z., et al. Development of a RAD-Seq Based DNA Polymorphism Identification Software, AgroMarker Finder, and Its Application in Rice Marker-Assisted Breeding. *PLoS One*. 2016;11:e0147187.
21. Catchen J., Hohenlohe P. A., Bassham S., Amores A. and Cresko W. A. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol*. 2013;22:3124-3140.
22. Reitzel A. M., Herrera S., Layden M. J., Martindale M. Q. and Shank T. M. Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Mol Ecol*. 2013;22:2953-2970.
23. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One*. 2016;11:e0151651.
24. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One*. 2016;11:e0151651.

综述

- Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. **Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics.** *Nat Rev Genet.* 2016;17:81-92.
- da Fonseca R. R., Albrechtsen A., Themudo G. E., et al. **Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms.** *Mar Genomics.* 2016;30:3-13.
- Kagale S., Koh C., Clarke W. E., et al. **Analysis of Genotyping-by-Sequencing (GBS) Data.** *Methods Mol Biol.* 2016;1374:269-284.
- Kim C., Guo H., Kong W., et al. **Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs.** *Plant Sci.* 2016;242:14-22.
- Manel S., Perrier C., Pralogn M., et al. **Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans.** *Mol Ecol.* 2016;25:170-184.
- Sanders I. R. and Rodriguez A. **Aligning molecular studies of mycorrhizal fungal diversity with ecologically important levels of diversity in ecosystems.** *ISME J.* 2016;10:2780-2786.

参考文献

Ren P., Peng W., You W., et al. **Genetic mapping and quantitative trait loci analysis of growth-related traits in the small abalone *Haliotis diversicolor* using restriction-site-associated DNA sequencing.** *Aquaculture.* 2016;454:163-170.

作者利用 RAD-seq 生成杂色鲍的高分辨率连锁图以进行生长相关的数量性状基因位点 (QTL) 分析。他们构建出包含 3756 个基因位点的代表性数据库能够涵盖 95% 的后代。作者根据该图谱鉴定出 6 个生长相关性状的 15 个 QTL。

Illumina 技术: **HiSeq 2000 系统**

Wang J., Xue D. X., Zhang B. D., et al. **Genome-Wide SNP Discovery, Genotyping and Their Preliminary Applications for Population Genetic Inference in Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*).** *PLoS One.* 2016;11:e0157809.

研究人员利用 PE RAD-seq 研究了来自 2 个花鲈群体的 30 个个体, 发现了花鲈基因组上的 22,648 个 SNP。结果表明 2 个群体间存在细微但显著的遗传分化。

Illumina 技术: **HiSeq 2500 系统**

He T., D'Agui H., Lim S. L., Enright N. J. and Luo Y. **Evolutionary potential and adaptation of *Banksia attenuata* (Proteaceae) to climate and fire regime in southwestern Australia, a global biodiversity hotspot.** *Sci Rep.* 2016;6:26315.

该研究对 80 种植物进行了 RAD-seq 和环境关联分析, 并发现了与降水梯度、温度以及火灾间隔相关的候选基因。作者发现整个群体的适应性遗传变异受火灾间隔缩短的影响显著, 而降水减少和温度上升并未带来可检出影响。进一步的基因注释结果还发现了 4 个具有抗逆性作用的基因, 包括气孔张合调控方式、能量的使用以及为适应气候和火灾间隔而出现的形态发生。

Illumina 技术: **HiSeq 2000 系统**

Paun O., Turner B., Trucchi E., et al. **Processes Driving the Adaptive Radiation of a Tropical Tree (*Diospyros*, Ebenaceae) in New Caledonia, a Biodiversity Hotspot.** *Syst Biol.* 2016;65:212-227.

作者利用 RAD-seq 分析近期在新喀里多尼亚受到辐射的 21 个二倍体柿属植物间的系统发育关系。该数据集包含了来自 39 个种群的 84 株个体。通常 8400 个经过筛选的 SNP 即可进行物种界定并生成有说服力的系统发生树。

Illumina 技术: **HiSeq 2000**

Bian C., Hu Y., Ravi V., et al. **The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts.** *Sci Rep.* 2016;6:24501.

Clark L. V. and Sacks E. J. **TagDigger: user-friendly extraction of read counts from GBS and RAD-seq data.** *Source Code Biol Med.* 2016;11:11, Hou Y., Nowak M. D., Mirre V., et al. **RAD-seq data point to a northern origin of the arctic-alpine genus *Cassiope* (Ericaceae).** *Mol Phylogenet Evol.* 2015;95:152-160.

Diaz-Arce N., Arrizabalaga H., Murua H., Irigoien X. and Rodriguez-Ezpeleta N. **RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas.** *Mol Phylogenet Evol.* 2016;102:202-207.

Diaz-Arce N., Arrizabalaga H., Murua H., Irigoien X. and Rodriguez-Ezpeleta N. **RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas.** *Mol Phylogenet Evol.* 2016;102:202-207.

Fan W., Zong J., Luo Z., Chen M., Zhao X., et al. **Development of a RAD-Seq Based DNA Polymorphism Identification Software, AgroMarker Finder, and Its Application in Rice Marker-Assisted Breeding.** *PLoS One.* 2016;11:e0147187.

Fernandez R., Schubert M., Vargas-Velazquez A. M., et al. **A genomewide catalogue of single nucleotide polymorphisms in white-beaked and Atlantic white-sided dolphins.** *Mol Ecol Resour.* 2016;16:266-276.

- Herrera S. and Shank T. M. RAD sequencing enables unprecedented phylogenetic resolution and objective species delimitation in recalcitrant divergent taxa. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;100:70-79.
- Jiang N., Zhang F., Wu J., et al. A highly robust and optimized sequence-based approach for genetic polymorphism discovery and genotyping in large plant populations. *Theor Appl Genet.* 2016;129:1739-1757.
- Manthey J. D. and Robbins M. B. Genomic insights into hybridization in a localized region of sympatry between pewee sister species (*Contopus sordidulus* × *C. virens*) and their chromosomal patterns of differentiation. *Avian Research.* 2016;7:.
- Qiu S., Bergero R., Guirao-Rico S., et al. RAD mapping reveals an evolving, polymorphic and fuzzy boundary of a plant pseudoautosomal region. *Mol Ecol.* 2016;25:414-430.
- Ravinet M., Westram A., Johannesson K., et al. Shared and nonshared genomic divergence in parallel ecotypes of *Littorina saxatilis* at a local scale. *Mol Ecol.* 2016;25:287-305.
- Takahashi T. and Sota T. A robust phylogeny among major lineages of the East African cichlids. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;100:234-242.
- Yang H., Wei C. L., Liu H. W., et al. Genetic Divergence between *Camellia sinensis* and Its Wild Relatives Revealed via Genome-Wide SNPs from RAD Sequencing. *PLoS One.* 2016;11:e0151424.
- Yang J., Guo B., Shikano T., Liu X. and Merila J. Quantitative trait locus analysis of body shape divergence in nine-spined sticklebacks based on high-density SNP-panel. *Sci Rep.* 2016;6:26632.
- Zhao Y., Zhang C., Chen H., et al. QTL mapping for bacterial wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Mol Breed.* 2016;36:13.
- Combosch D. J. and Vollmer S. V. Trans-Pacific RAD-Seq population genomics confirms introgressive hybridization in Eastern Pacific *Pocillopora* corals. *Mol Phylogenet Evol.* 2015;.
- DaCosta J. M. and Sorenson M. D. ddRAD-seq phylogenetics based on nucleotide, indel, and presence-absence polymorphisms: Analyses of two avian genera with contrasting histories. *Mol Phylogenet Evol.* 2015;.
- Demos T. C., Kerbis Peterhans J. C., Joseph T. A., et al. Comparative Population Genomics of African Montane Forest Mammals Support Population Persistence across a Climatic Gradient and Quaternary Climatic Cycles. *PLoS One.* 2015;10:e0131800.
- Guo B., DeFaveri J., Sotelo G., Nair A. and Merila J. Population genomic evidence for adaptive differentiation in Baltic Sea three-spined sticklebacks. *BMC Biol.* 2015;13:19.
- Liu S., Clark L. V., Swaminathan K., et al. High-density genetic map of *Miscanthus sinensis* reveals inheritance of zebra stripe. *GCB Bioenergy.* 2016;8:616-630.
- Longo G. and Bernardi G. The evolutionary history of the embiotocid surperch radiation based on genome-wide RAD sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 2015;88:55-63.
- Marubodee R., Ogiso-Tanaka E., Isemura T., et al. Construction of an SSR and RAD-Marker Based Molecular Linkage Map of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *PLoS One.* 2015;10:e0138942.
- Mathers T. C., Hammond R. L., Jenner R. A., et al. Transition in sexual system and sex chromosome evolution in the tadpole shrimp *Triops cancriformis*. *Heredity* (Edinb). 2015;.
- Shao C., Niu Y., Rastas P., et al. Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL mapping of *Vibrio anguillarum* disease resistance and comparative genomic analysis. *DNA Res.* 2015;.
- Takahashi T. and Moreno E. A RAD-based phylogenetics for *Orestias* fishes from Lake Titicaca. *Mol Phylogenet Evol.* 2015;.
- Tennessen J. A., Bonner K. M., Bollmann S. R., et al. Genome-Wide Scan and Test of Candidate Genes in the Snail *Biomphalaria glabrata* Reveal New Locus Influencing Resistance to *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004077.
- Yu S., Chu W., Zhang L., et al. Identification of Laying-Related SNP Markers in Geese Using RAD Sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0131572.
- Zhou Z., Liu S., Dong Y., et al. High-Density Genetic Mapping with Interspecific Hybrids of Two Sea Urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius*, by RAD Sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0138585.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

ddRADseq: 双重消化限制性酶切位点关联的 DNA 标记生成

ddRADseq²⁵ (又称 ddRAD) 演变自 RAD 测序方案²⁶, 用于 SNP 发现和基因分型^{27,28}。在该演变方法中, 片段剪切被第二次限制性酶切代替, 目的是提升片段大小选择步骤的可调性和准确性。该方案还包括另添加一个标签以实现组合标记。目前已开发出多个不同的 RAD 方案 (例如 2b-RAD²⁹、SLAF-seq³⁰ 和 hyRAD³¹) 来解决具体的应用问题, 并提供有多种软件包用以分析 RAD 数据^{32,33}。

在该方法中, 先用限制性酶消化 gDNA, 然后将带有条形码的 P1 接头连接到片段上。将来自不同样本的带接头的片段混合 (如要进行多样本测序), 然后使用另一种限制性酶消化 DNA。根据片段大小进行选择, 然后纯化。连接 P2 接头 - 引物, 然后扩增片段以生成测序文库。



ddRADseq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需参考基因组³⁴• 价格低于全基因组测序• 可通过选择不同的限制性酶调整基因组覆盖度 | <ul style="list-style-type: none">• 基因组覆盖可能存在空缺区域• 需要使用高质量 DNA (请参阅适用于低质量 DNA 的 hyRAD³⁵) |

综述

Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet.* 2016;17:81-92.

Kagale S., Koh C., Clarke W. E., Bollina V., Parkin I. A., et al. Analysis of Genotyping-by-Sequencing (GBS) Data. *Methods Mol Biol.* 2016;1374:269-284.

25. Peterson B. K., Weber J. N., Kay E. H., Fisher H. S. and Hoekstra H. E. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One.* 2012;7:e37135.
26. Baird N. A., Etter P. D., Atwood T. S., et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One.* 2008;3:e3376.
27. Baird N. A., Etter P. D., Atwood T. S., et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One.* 2008;3:e3376.
28. Willing E. M., Hoffmann M., Klein J. D., Weigel D. and Dreyer C. Paired-end RAD-seq for de novo assembly and marker design without available reference. *Bioinformatics.* 2011;27:2187-2193.
29. Wang S., Meyer E., McKay J. K. and Matz M. V. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nat Methods.* 2012;9:808-810.
30. Sun X., Liu D., Zhang X., et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One.* 2013;8:e58700.
31. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One.* 2016;11:e0151651.
32. Fan W., Zong J., Luo Z., et al. Development of a RAD-Seq Based DNA Polymorphism Identification Software, AgroMarker Finder, and Its Application in Rice Marker-Assisted Breeding. *PLoS One.* 2016;11:e0147187.
33. Catchen J., Hohenlohe P. A., Bassham S., Amores A. and Cresko W. A. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol.* 2013;22:3124-3140.
34. Reitzel A. M., Herrera S., Layden M. J., Martindale M. Q. and Shank T. M. Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Mol Ecol.* 2013;22:2953-2970.
35. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One.* 2016;11:e0151651.

参考文献

DaCosta J. M. and Sorenson M. D. ddRAD-seq phylogenetics based on nucleotide, indel, and presence-absence polymorphisms: Analyses of two avian genera with contrasting histories. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;94:122-135.

本研究利用 ddRADseq 进行了火雀 (*Lagonosticta firefinch*) (梅花雀科) 和维达巢寄生雀 (*Vidua brood parasitic finch*) (维达鸟科) 的系统进化分析。尽管两个物种约在两千万年前分化, 研究人员仍然得到了 1000 个以上同源基因位点。除核苷酸多态性外, ddRADseq 数据还提供了各种插入缺失和基因位点存在 / 缺失的多态性, 其一致性指标均优于线粒体 DNA (mtDNA) 序列数据。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Lal M. M., Southgate P. C., Jerry D. R. and Zenger K. R. Fishing for divergence in a sea of connectivity: The utility of ddRADseq genotyping in a marine invertebrate, the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Mar Genomics.* 2016;25:57-68.

作者将 ddRADseq 用于黑蝶贝研究并在基因组范围内检测出 5243 个高质量 SNP 标记。这些标记可评估群体结构和基因组多样性。对来自斐济群岛的 3 个野生种群和 1 个繁育种群的 156 个个体进行关联性研究。作者还发现了野生种群间存在细微但显著的种群结构差异。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Brown J. K., Taggart J. B., Bekaert M., et al. Mapping the sex determination locus in the hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ddRAD sequencing. *BMC Genomics.* 2016;17:448.

Clark L. V. and Sacks E. J. TagDigger: user-friendly extraction of read counts from GBS and RAD-seq data. *Source Code Biol Med.* 2016;11:11.

Hou Y., Nowak M. D., Mirre V., et al. RAD-seq data point to a northern origin of the arctic-alpine genus *Cassiope* (Ericaceae). *Mol Phylogenet Evol.* 2016;95:152-160.

Shirasawa K., Hirakawa H. and Isobe S. Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and *in silico* optimization in tomato. *DNA Res.* 2016;23:145-153.

Wu Z., Wang B., Chen X., et al. Evaluation of Linkage Disequilibrium Pattern and Association Study on Seed Oil Content in *Brassica napus* Using ddRAD Sequencing. *PLoS One.* 2016;11:e0146383.

Yang G. Q., Chen Y. M., Wang J. P., et al. Development of a universal and simplified ddRAD library preparation approach for SNP discovery and genotyping in angiosperm plants. *Plant Methods.* 2016;12:39.

Cai G., Yang Q., Yi B., et al. A bi-filtering method for processing single nucleotide polymorphism array data improves the quality of genetic map and accuracy of quantitative trait locus mapping in doubled haploid populations of polyploid *Brassica napus*. *BMC Genomics.* 2015;16:409.

Davik J., Sargent D. J., Brurberg M. B., et al. A ddRAD Based Linkage Map of the Cultivated Strawberry, *Fragaria xananassa*. *PLoS One.* 2015;10:e0137746.

Leache A. D., Banbury B. L., Felsenstein J., de Oca A. N. and Stamatakis A. Short Tree, Long Tree, Right Tree, Wrong Tree: New Acquisition Bias Corrections for Inferring SNP Phylogenies. *Syst Biol.* 2015;64:1032-1047.

Leache A. D., Chavez A. S., Jones L. N., et al. Phylogenomics of phrynosomatid lizards: conflicting signals from sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing. *Genome Biol Evol.* 2015;7:706-719.

Meik J. M., Streicher J. W., Lawing A. M., Flores-Villela O. and Fujita M. K. Limitations of climatic data for inferring species boundaries: insights from speckled rattlesnakes. *PLoS One.* 2015;10:e0131435.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

2b-RAD: 基于 IIB 型限制性内切酶的 RAD

2b-RAD 与 ddRadseq 类似，只不过采用的是 IIB 型限制性内切酶（BsaXI 或 Alfl），该酶可对识别位点的上下游进行酶切。这样可将目标基因组剪切成大量长度固定（33 bp（BsaXI）或 36 bp（Alfl））的 DNA 片段。对上述短 DNA 片段进行测序即可确定遗传变异。

在该方法中，先用限制性内切酶（BsaXI）消化 gDNA，然后将带有部分（NNN）突出端的接头连接到片段上。将来自不同样本的连接有接头的片段混合，然后扩增片段以生成测序文库。



2b-RAD 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">高度简化的 2b-RAD 文库使基因分型所需的测序工作也大大减少标记密度高无需中间纯化，可减少损失并缩短处理时间 | <ul style="list-style-type: none">需要参考基因组短标签的长度可能不足以满足复杂基因组内基因位点的高效识别 |

综述

Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. [Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics](#). *Nat Rev Genet.* 2016.

da Fonseca R. R., Albrechtsen A., Themudo G. E., Ramos-Madriral J., Sibbesen J. A., et al. [Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms](#). *Mar Genomics.* 2016;30:3-13.

Jiang N., Zhang F., Wu J., Chen Y., Hu X., et al. A highly robust and optimized sequence-based approach for genetic polymorphism discovery and genotyping in large plant populations. *Theor Appl Genet.* 2016;129:1739-1757.

Kagale S., Koh C., Clarke W. E., Bollina V., Parkin I. A., et al. [Analysis of Genotyping-by-Sequencing \(GBS\) Data](#). *Methods Mol Biol.* 2016;1374:269-284.

Manel S., Perrier C., Pratloug M., Abi-Rached L., Paganini J., et al. Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans. *Mol Ecol.* 2016;25:170-184.

参考文献

Pecoraro C., Babbucci M., Villamor A., et al. [Methodological assessment of 2b-RAD genotyping technique for population structure inferences in yellowfin tuna \(*Thunnus albacares*\)](#). *Mar Genomics.* 2016;25:43-48.

我们对黄鳍金枪鱼（*Thunnus albacares*）的全球种群遗传结构知之甚少。作者利用 2b-RAD 证明了不同海域间的种群结构存在细微但显著的差异（固定指数（ F_{ST} ）= 0.0273； $P < 0.01$ ）。主成分的判别分析结果支持三个海域中存在遗传分离的黄鳍金枪鱼种群。

illumina 技术：HiSeq 2500 系统

Fu B., Liu H., Yu X. and Tong J. [A high-density genetic map and growth related QTL mapping in bighead carp \(*Hypophthalmichthys nobilis*\)](#). *Sci Rep.* 2016;6:28679.

作者对 F1 家族中的 117 个个体进行了 2b-RAD 测序，构建了一个包含 3121 个 SNP 标记的图谱。根据该遗传图谱，作者鉴定出 1 个基因组范围的显著 QTL 和 37 个提示性 QTL（与 6 个连锁群（LG3、LG11、LG15、LG18、LG19 和 LG22）中的 5 个生长相关性状有关）。

illumina 技术：HiSeq 2500 系统

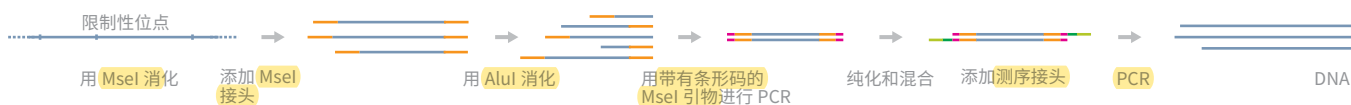
相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

SLAF-seq: 特异性位点扩增片段测序

SLAF-seq 是优化版的 ddRADseq, 专门用于大规模基因分型实验。³⁶

利用训练数据优化了酶和限制性酶切片大小以确保均匀分布并避免重复。片段大小选择范围也更窄, 目的是优化 PCR 扩增。该方案与 ddRAD 类似, 都是先用 MseI 进行第一次消化、加热失活然后用 AluI 进行第二次消化。对得到的片段进行 PCR 扩增、添加接头然后纯化片段, 以生成测序文库。



SLAF-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">深度测序可保障基因分型准确性简化代表性策略可降低测序成本预先设计的简化代表性方案可优化标记效率双条形码系统适用于大型种群测序 | <ul style="list-style-type: none">不覆盖整个基因组 |

综述

Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet.* 2016;.

参考文献

Zhao X., Huang L., Zhang X., et al. Construction of high-density genetic linkage map and identification of flowering-time QTLs in orchardgrass using SSRs and SLAF-seq. *Sci Rep.* 2016;6:29345.

作者利用 SLAF-seq 开发出 447,177 个标记, 并利用这些标记在多年生黑麦草与鸭茅之间进行比较基因组学分析。找到 2 个目标性状 (抽穗期 (HD) 和花期 (FT)) 的 11 个潜在的显著 QTL。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Geng X., Jiang C., Yang J., et al. Rapid Identification of Candidate Genes for Seed Weight Using the SLAF-Seq Method in *Brassica napus*. *PLoS One.* 2016;11:e0147580.

研究人员利用 SLAF-seq 进行关联分析和混合分组分析, 以确定种子千粒重 (TSW) 的候选基因。共发现了 1933 个高质量多态性 SLAF 标记和 4 个 TSW 关联标记。

Illumina 技术: HiSeq 2500

Zhang J., Yuan H., Li M., et al. A High-Density Genetic Map of Tetraploid *Salix matsudana* Using Specific Length Amplified Fragment Sequencing (SLAF-seq). *PLoS One.* 2016;11:e0157777.

作者以盐敏感的“Yanjiang”乔木树种 (旱柳) 作为母本并以耐盐品种“9901”作为父本杂交得到种内 F1 代杂交种群。然后对该种群及其亲本进行基因分型。两亲本及后代均为四倍体, 但作者能够构建包含 6737 个 SLAF 标记的遗传图谱。其数据将用于定位调控柳属耐盐性和抗盐性的数量性状基因位点。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

36. Sun X., Liu D., Zhang X., et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One.* 2013;8:e58700.

- Wei Q. Z., Fu W. Y., Wang Y. Z., et al. Rapid identification of fruit length loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using next-generation sequencing (NGS)-based QTL analysis. *Sci Rep*. 2016;6:27496.
- Xu X., Chao J., Cheng X., et al. Mapping of a Novel Race Specific Resistance Gene to Phytophthora Root Rot of Pepper (*Capsicum annuum*) Using Bulk Segregant Analysis Combined with Specific Length Amplified Fragment Sequencing Strategy. *PLoS One*. 2016;11:e0151401.
- Ye Y., Cai M., Ju Y., et al. Identification and Validation of SNP Markers Linked to Dwarf Traits Using SLAF-Seq Technology in *Lagerstroemia*. *PLoS One*. 2016;11:e0158970.
- Zhang H., Yi H., Wu M., et al. Mapping the Flavor Contributing Traits on "Fengwei Melon" (*Cucumis melo* L.) Chromosomes Using Parent Resequencing and Super Bulk Segregant Analysis. *PLoS One*. 2016;11:e0148150.
- Cai C., Cheng F. Y., Wu J., Zhong Y. and Liu G. The First High-Density Genetic Map Construction in Tree Peony (*Paeonia Sect. Moutan*) using Genotyping by Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing. *PLoS One*. 2015;10:e0128584.
- Ma J. Q., Huang L., Ma C. L., et al. Large-Scale SNP Discovery and Genotyping for Constructing a High-Density Genetic Map of Tea Plant Using Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing (SLAF-seq). *PLoS One*. 2015;10:e0128798.
- Qin D., Dong J., Xu F., et al. Characterization and fine mapping of a novel barley Stage Green-Revertible Albino Gene (HvSGRA) by Bulk Segregant Analysis based on SSR assay and Specific Length Amplified Fragment Sequencing. *BMC Genomics*. 2015;16:838.
- Shan T., Pang S., Li J., Li X. and Su L. Construction of a high-density genetic map and mapping of a sex-linked locus for the brown alga *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) based on large scale marker development by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Genomics*. 2015;16:902.
- Wang J., Zhang K., Zhang X., et al. Construction of Commercial Sweet Cherry Linkage Maps and QTL Analysis for Trunk Diameter. *PLoS One*. 2015;10:e0141261.
- Wang W., Zhang T., Zhang G., et al. Genome-wide association study of antibody level response to NDV and IBV in Jinghai yellow chicken based on SLAF-seq technology. *J Appl Genet*. 2015;56:365-373.
- Xu F., Sun X., Chen Y., et al. Rapid identification of major QTLs associated with rice grain weight and their utilization. *PLoS One*. 2015;10:e0122206.
- Xu X., Lu L., Zhu B., et al. QTL mapping of cucumber fruit flesh thickness by SLAF-seq. *Sci Rep*. 2015;5:15829.
- Xu Y., Huang L., Ji D., et al. Construction of a dense genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for economic traits of a doubled haploid population of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *BMC Plant Biol*. 2015;15:228.
- Zhang J., Zhang Q., Cheng T., et al. High-density genetic map construction and identification of a locus controlling weeping trait in an ornamental woody plant (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *DNA Res*. 2015;22:183-191.
- Zhang Y., Zhang J., Huang L., et al. A high-density genetic map for P genome of *Agropyron Gaertn.* based on specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Planta*. 2015;242:1335-1347.

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

hyRAD: 降解 DNA 的杂交 RAD

hyRAD³⁷ 开发来用于处理降解的 DNA 样本，如博物馆收藏品中提取的 DNA 样本。博物馆可提供各种极具研究价值的标本，但样本中的降解 DNA 无法承受 ddRAD 所需的双重消化和样本分离³⁸。为解决此问题，hyRAD 利用生物素标记的探针和链霉亲和素包被磁珠来捕获并富集目标片段。

该过程的第一步是通过高质量 DNA 建立 ddRAD 文库，DNA 一般提取自现存标本。根据片段大小进行选择，然后生物素化。之后作为探针用于杂交捕获鸟枪法构建的文库或 ddRad 文库。



hyRAD 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可用于降解的 DNA• 可用于未经测序的基因组 | <ul style="list-style-type: none">• 覆盖度不及高质量样本 |

综述

Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet.* 2016;

Holmes M. W., Hammond T. T., Wogan G. O., et al. Natural history collections as windows on evolutionary processes. *Mol Ecol.* 2016;25:864-881.

参考文献

Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., Kostikova A., Schmid S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One.* 2016;11:e0151651.

该研究介绍了 hyRAD 方案并证明了其性能。研究人员通过检测非模式蝴蝶物种的新鲜样本和博物馆样本获得了大量直系同源基因位点。他们发现所分析的全部 8 个标本（包括已有 58 年历史的博物馆样本）中均存在很高比例的 SNP。

Illumina 技术：MiSeq 系统、HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

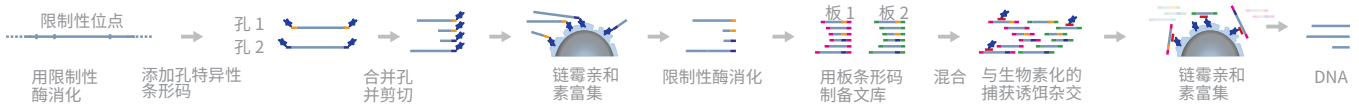
37. Suchan T., Pitteloud C., Gerasimova N. S., et al. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS One.* 2016;11:e0151651.

38. Peterson B. K., Weber J. N., Kay E. H., Fisher H. S. and Hoekstra H. E. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One.* 2012;7:e37135.

Rapture: 限制性酶切位点关联的 DNA 捕获技术

Rapture 是一种大规模并行靶向 DNA 测序技术，该技术将 RAD-seq 与序列捕获相结合以比较大量样本中的多个目标基因。靶向测序是通过识别非常靠近目标基因位点的限制性酶切位点实现的。

将 gDNA 样本混入板中各孔，然后用选定的限制性内切酶消化。先将带有孔特异性条形码的生物素化 RAD 接头连接至粘性末端，然后再将各个板孔内的片段混合。对带有条形码的 DNA 片段进行随机剪切，然后使其结合至链霉亲和素微珠。再次使用限制性酶消化，片段从链霉亲和素微珠上切下来，并用于带有板特异性条形码标签的标准 DNA 文库制备试剂盒。然后将两板中的文库混合，先与每种 RAD 标签特定的生物素化诱饵-寡核苷酸杂交，最后再通过链霉亲和素将片段分离。对分离出的 DNA 片段进行测序并按其 RAD 标签、板条形码和孔条形码排列。



Rapture 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">大规模并行靶向 DNA 测序，可用于 SNP 鉴定相较于 RAD-seq，比对上的片段数和基因位点覆盖度得到提升 | <ul style="list-style-type: none">实验前需要设计 RAD 标签诱饵合成导致成本增加仅审视少量基因位点偏向序列位置与限制性酶切位点距离较近 |

综述

Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet.* 2016;

参考文献

Ali O. A., O'Rourke S. M., Amish S. J., Meek M. H., Luikart G., et al. RAD Capture (Rapture): Flexible and Efficient Sequence-Based Genotyping. *Genetics.* 2016;202:389-400.

该文献介绍了最初的 Rapture 实验方案。为测试该方法，研究人员分析了 96 条虹鳟鱼个体的鱼鳍。所捕获基因位点的平均覆盖度为 16 x，相比之下 RAD 的平均覆盖度为 0.4 x。在主成分分析中，第一个主成分分离出 2 个独立的群体，分别对应于出生在熊溪和泉源产卵地（Thousands Springs 和 Spring Creek）的个体。第三个成分分离出的是来自 Thousand Springs 和 Spring Creek 的个体。上述结果表明其空间分析相当精细。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

39. Ali O. A., O'Rourke S. M., Amish S. J., et al. RAD Capture (Rapture): Flexible and Efficient Sequence-Based Genotyping. *Genetics.* 2016;202:389-400.

Digenome-seq: Cas9 酶消化全基因组测序

Digenome-seq 设计用于分析基因组范围内 Cas9 的脱靶效应。⁴⁰Digenome-seq 的多重分析版也已发表。⁴¹ 该技术是包括 HTGTS⁴²、LAM-HTGTS⁴³ 和 Guide-seq⁴⁴ 在内的一系列方法，目的是检测规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) /Cas9 及其他 RNA 引导性核酸酶 (RGEN) 的脱靶效应。

该方法通过对体外核酸酶消化的基因组 (digenomes) 进行测序来检测由大量细胞中的 RGEN 诱导的脱靶突变。上述消化过程会产生许多 5 末端相同的 DNA 片段 (可在裂解位点处垂直对齐)。



Digenome-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 依靠 DNA 裂解，而不是结合• 在基因组背景下进行，并捕获具有 DNA/RNA 凸起的位点• 脱靶效应检出频率为 0.1% 或更低⁴⁵ | <ul style="list-style-type: none">• 需要体内裂解确证⁴⁶• 需要高水平的生物信息学分析⁴⁶ |

综述

Lee C. M., Cradick T. J., Fine E. J. and Bao G. Nuclease Target Site Selection for Maximizing On-target Activity and Minimizing Off-target Effects in Genome Editing. *Mol Ther.* 2016;24:475-487.

Mei Y., Wang Y., Chen H., Sun Z. S. and Ju X. D. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics.* 2016;43:63-75.

参考文献

Kim D., Kim J., Hur J. K., et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:863-868.

为检测 Cpf1 内切酶是否能够代替 Cas9 以提高基因编辑精度，作者采用了不匹配的 CRISPR RNA (crRNA)。他们发现 Cpf1 允许 3 前间区序列邻近基序 (PAM) 远侧区存在一个或两个错配，但不允许在 5'-PAM 近侧区存在错配。随后他们利用 Digenome-seq 在基因组范围内对 8 种 Cpf1 核酸酶的裂解位点进行了分析。其结果表明，毛螺科菌的 Cpf1 (LbCpf1) 和氨基酸球菌属的 Cpf1 (AsCpf1) 在人类基因组上分别有 6 个和 12 个裂解位点，而 Cas9 核酸酶的切割位点通常在 90 处以上。鉴定出的大部分 Cpf1 裂解位点都不会使细胞发生突变。作者还在 3PAM- 远侧区或经体外验证的 12 个脱靶位点的 PAM 序列中发现了错配。预装配的重组 Cpf1 核糖核蛋白使脱靶效应得以消除。

Illumina 技术: HiSeq X Ten 系统、TruSeq DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

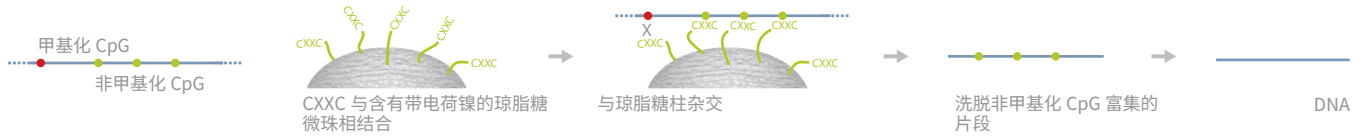
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

40. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.
41. Kim D., Kim S., Kim S., Park J. and Kim J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.
42. Chiarle R., Zhang Y., Frock R. L., et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell.* 2011;147:107-119.
43. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.
44. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.
45. Mei Y., Wang Y., Chen H., Sun Z. S. and Ju X. D. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics.* 2016;43:63-75.
46. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

CAP-seq: CXXC 亲和纯化测序

CAP-seq 可定位 gDNA 中的甲基化 CpGs⁴⁷。

在该方法中，将 DNA 与连有 CXXC 的镍填充琼脂糖微珠一同孵育。然后，将 DNA 从复合物上洗脱并对其进行测序。深度测序帮助我们深入了解了 gDNA 中的 CpG 位点。



CAP-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 靶定 CpG 岛 | <ul style="list-style-type: none">• 尚未发现 |

综述

Vilborg A., Passarelli M. C., Yario T. A., Tycowski K. T. and Steitz J. A. Widespread Inducible Transcription Downstream of Human Genes. *Mol Cell*. 2015;59:449-461.

Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820.

Suzuki M. M., Yoshinari A., Obara M., et al. Identical sets of methylated and nonmethylated genes in *Ciona intestinalis* sperm and muscle cells. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6:38.

参考文献

尚无

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

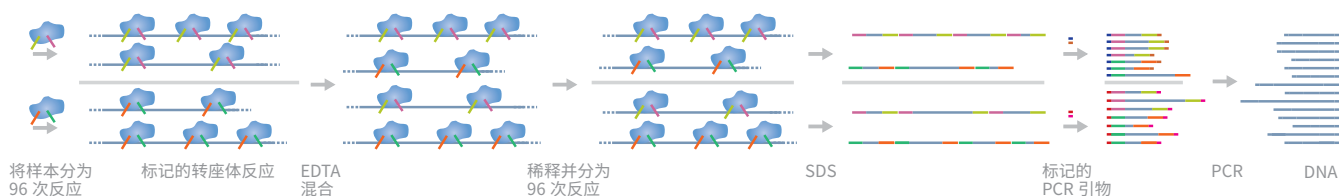
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

47. Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001134.

CPT-seq: 能保留邻近序列信息的转座子酶测序

CPT-seq 是一种基于能保留邻近的序列信息的转座子酶 (CPT) 和组合标签的基因组范围内单体分型方法。⁴⁸

利用 Tn5 转座子酶, 实现在使用接头和标签序列修饰 DNA 的同时保留邻近的序列信息。在完成 DNA 稀释和区分后去除转座酶, 然后将区分出的 DNA 用独立的标签标记。标记后的文库分子富集完成后再通过 PCR 进一步标记。转座子酶切和 PCR 阶段的 96 重组标签可区分出近 10,000 个虚拟区室。



CPT-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 标记程度高并且高效• FragScaff 表明该方法可通过 CPT-seq 数据高效拼接大型基因组⁴⁹• 每个实际区室中设置了大量有效虚拟区室, 可避免与多重置换扩增技术 (MDA) 相关的扩增偏向⁵⁰ | <ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用 |

综述

Mostovoy Y., Levy-Sakin M., Lam J., et al. A hybrid approach for *de novo* human genome sequence assembly and phasing. *Nat Methods*. 2016;13:587-590.

Snyder M. W., Adey A., Kitzman J. O. and Shendure J. Haplotype-resolved genome sequencing: experimental methods and applications. *Nat Rev Genet*. 2015;16:344-358.

参考文献

Amini S., Pushkarev D., Christiansen L., Kostem E., Royce T., et al. Haplotype-resolved whole-genome sequencing by contiguity-preserving transposition and combinatorial indexing. *Nat Genet*. 2014;46:1343-1349.

该文献介绍了最初的 CPT-seq 方法。作者将人类基因组中 95% 以上的杂合变异准确组装成长单倍型区块 (N50 = 1.4-2.3 Mb), 以此证明了该方法的可行性。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

48. Kuleshov V., Snyder M. P. and Batzoglu S. Genome assembly from synthetic long read clouds. *Bioinformatics*. 2016;32:i216-i224.

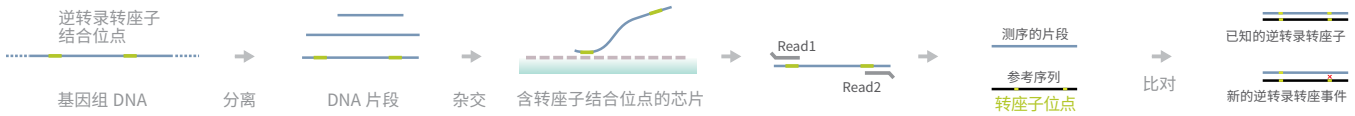
49. Cao C.-c. and Sun X. Combinatorial pooled sequencing: experiment design and decoding. *Quantitative Biology*. 2016;4:36-46.

50. Amini S., Pushkarev D., Christiansen L., et al. Haplotype-resolved whole-genome sequencing by contiguity-preserving transposition and combinatorial indexing. *Nat Genet*. 2014;46:1343-1349.

RC-Seq: 反转录转座子捕获测序

RC-seq 是一种用于定位和研究反转录转座子插入位点的高通量实验方案⁵¹。

在该方法中, gDNA 分离后, DNA 上的反转录转座子结合位点与芯片上的转座子结合位点杂交。深度测序给出的精准信息能够用于与参考序列比对来发现新的反转录转座事件。另外还介绍了单细胞版 (scRC-seq)⁵²。



RC-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够明确鉴定并检出新反转录转座事件• 可专门研究转座子目标结合位点• 通量高• PCR 验证率预计为 98.5% | <ul style="list-style-type: none">• 不同类型的移动元件插入 (MEI) 需要使用不同的引物进行独立的 PCR 实验⁵³• 杂交错误会导致测到不需要的 DNA 片段• PCR 偏向会导致高 GC 含量的模板数据偏低• 相似的转座结合位点会导致测序结果不明确以及检出转座事件 |

综述

Xing J., Witherspoon D. J. and Jorde L. B. Mobile element biology: new possibilities with high-throughput sequencing. *Trends Genet.* 2013;29:280-289.

参考文献

Klawitter S., Fuchs N. V., Upton K. R., et al. Reprogramming triggers endogenous L1 and Alu retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2016;7:10286.

研究人员利用 RC-seq 定位人类诱导性多功能干细胞 (hiPSC) 中从头反转录转座子插入的基因组整合位点。他们希望确定激活 L1 调动机制是否会导致 L1-介导的反转录转座。研究人员检测了 40,608 个无参考反转录转座子插入, 并估算出每个 hiPSC 约携带 1 个从头 L1 插入。

illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Upton K. R., Gerhardt D. J., Jesuadian J. S., Richardson S. R., Sanchez-Luque F. J., et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell.* 2015;161:228-239.

作者对人类个体的海马神经元、神经胶质以及皮质神经元进行了 scRC-seq 测序。他们估算出每个海马神经元发生 13.7 次体细胞 L1 插入, 并携带有靶序列引导逆转录 (RT) 的标志序列。该结果表明海马神经元中表达的基因组位点上普遍存在 L1 镶嵌性。

illumina 技术: 非指定 illumina 测序系统

Solyom S., Ewing A. D., Rahrmann E. P., et al. Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Res.* 2012;22:2328-2338.

Shukla R., Upton K. R., Munoz-Lopez M., et al. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell.* 2013;153:101-111.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

51. Baillie J. K., Barnett M. W., Upton K. R., et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature.* 2011;479:534-537.

52. Upton K. R., Gerhardt D. J., Jesuadian J. S., et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell.* 2015;161:228-239.

53. Xing J., Witherspoon D. J. and Jorde L. B. Mobile element biology: new possibilities with high-throughput sequencing. *Trends Genet.* 2013;29:280-289.

Tn-Seq: 转座子测序

INSeq: 插入测序

Tn-seq⁵⁴ 和 INSeq⁵⁵ 是两种几乎相同的方法，均可准确测定数量遗传相互作用。INSeq 在接头连接和 PCR 后设有聚丙烯酰胺凝胶纯化步骤，而 Tn-seq 采用的是琼脂糖凝胶纯化⁵⁶。

在该方法中，将侧翼区带有 MmeI 酶切位点的转座子转座至细菌，经培养后，该细菌有助于检测转座子内 DNA 的突变频率。完成 MmeI 酶解和后续的头连接步骤后，可通过 PCR 扩增和测序获取转座子插入位点的相关信息。



Tn-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可研究转座子突变频率• 可用于推断微生物内基因的适应性• 稳定、重复性好并且灵敏度高 | <ul style="list-style-type: none">• 仅限于细菌研究• PCR 扩增期间出错会导致测序结果不准确 |

综述

尚无。

参考文献

Hooven T. A., Catomeris A. J., Akabas L. H., et al. The essential genome of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics*. 2016;17:406.

为构建 B 族链球菌 (GBS) 的必需基因组，作者利用了能够在基因组的 TA 二核苷酸位点处插入的 Himar1 微型转座子。然后他们对采集自 3 个独立突变体库的 DNA 进行了 Tn-seq。在培养基中经过 24h 生长后，每个突变体库中至少拥有 135,000 个突变体。作者通过上述数据将 13.5% 的基因标记为必需并将 1.2% 标记为关键。

Illumina 技术: HiSeq 4000 系统

Le Breton Y., Belew A. T., Valdes K. M., et al. Essential Genes in the Core Genome of the Human Pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep*. 2015;5:9838.

作者开发了一套基于水手转座子的系统 (*Krmit*) 用于通过 Tn-seq 对 A 族链球菌 (GAS) 中的复杂突变体库进行全体监测。高度饱和的转座子库 (transposant library) 中大约每 25 个碱基就携带有 *Krmit* 插入。作者针对 GAS 血清型 M1T1 侵袭型菌株 5448 和 GAS 致肾炎血清型 M49 菌株 NZ131 分别标记了 227 个和 241 个上述基因。

Illumina 技术: HiSeq 1500 系统

54. van Opijnen T., Bodi K. L. and Camilli A. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods*. 2009;6:767-772.
55. Goodman A. L., McNulty N. P., Zhao Y., et al. Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat. *Cell Host Microbe*. 2009;6:279-289.
56. van Opijnen T. and Camilli A. Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:435-442.

- Liu F., Wang C., Wu Z., Zhang Q. and Liu P. A zero-inflated Poisson model for insertion tolerance analysis of genes based on Tn-seq data. *Bioinformatics*. 2016;32:1701-1708.
- DeJesus M. A., Ambadipudi C., Baker R., Sasseti C. and loerger T. R. TRANSIT--A Software Tool for Himar1 TnSeq Analysis. *PLoS Comput Biol*. 2015;11:e1004401.
- Lee S. A., Gallagher L. A., Thongdee M., et al. General and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:5189-5194.
- Meeske A. J., Sham L. T., Kimsey H., et al. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:6437-6442.
- Rubin B. E., Wetmore K. M., Price M. N., et al. The essential gene set of a photosynthetic organism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E6634-6643.
- Turner K. H., Wessel A. K., Palmer G. C., Murray J. L. and Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:4110-4115.
- Wu M., McNulty N. P., Rodionov D. A., et al. Genetic determinants of *in vivo* fitness and diet responsiveness in multiple human gut *Bacteroides*. *Science*. 2015;350:aac5992.

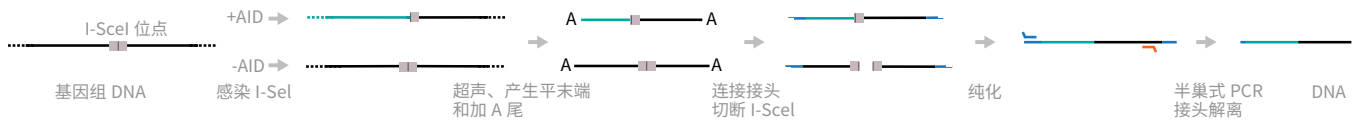
相关试剂盒

- TruSeq Nano DNA Library Prep Kit
- TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit
- Nextera DNA Library Prep Kit
- Nextera XT DNA Library Prep Kit

TC-Seq: 易位捕获测序

TC-Seq 专为研究染色体重排和染色体易位而开发⁵⁷。

在该方法中，用表达 I-SceI 位点的反转录病毒感染具有 / 不具有胞苷脱氨酶 (AICDA 或 AID) 活性的细胞。对细胞中的 gDNA 进行超声处理、连接接头、纯化和基于半巢式连接介导 (LM)-PCR 的扩增。切掉接头，然后对 DNA 进行测序。所有依赖 AID 的染色体重排将被 LM-PCR 扩增，而不依赖 AID 的染色体易位将被忽略。



TC-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">可在特定模型或环境下研究染色体易位随机超声打断会产生特异的接头连接点，而深度测序可通过重排断裂点进行读取 | <ul style="list-style-type: none">无法解析连接点结构相较于 LAM-HTGTS，成本高、灵敏度低⁵⁸PCR 扩增出错非线性 PCR 扩增导致的偏差会影响重现性PCR 偏向会导致高 GC 含量的模板数据量偏低。 |

综述

尚无

参考文献

Robbiani D. F., Deroubaix S., Feldhahn N., et al. Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell*. 2015;162:727-737.

夏氏疟原虫 (Pc) 可诱导生发中心 (GC) 长期表达。而生发中心是 B 细胞进行快速克隆扩增并表达 AID (一种 DNA 增变基因) 的唯一场所。作者利用 TC-Seq 检测 AID 诱导的损伤，并发现 Pc 感染期间诱导的 GC B 细胞存在大范围 DNA 损伤，进而导致染色体易位。尽管感染不会改变总体发生率，但导致患成熟 AID 依赖型 B 细胞淋巴瘤风险升高。因此，疟疾感染通过诱导 GC B 细胞长期表达 AID 而导致成熟 B 细胞瘤发生倾向。

Illumina 技术: 非指定 HiSeq 系统

Qian J., Wang Q., Dose M., et al. B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell*. 2014;159:1524-1537.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

57. Klein I. A., Resch W., Jankovic M., et al. Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell*. 2011;147:95-106.

58. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc*. 2016;11:853-871.

Rep-Seq: 组库测序

Ig-seq: 免疫球蛋白基因的 DNA 测序

MAF: 分子扩增指纹图谱分析

Rep-Seq 是一个组库测序技术方面的综合概念⁵⁹，它包括 Ig-seq⁶⁰ 和 MAF⁶¹。

Ig-seq 是一种通过与重排后可变区基因 (VDJ 重组体) 互补的引物扩增的靶向 gDNA 测序, 执行。用适合的 5' 引物对 gDNA 进行扩增。虽然通量较高, 但有关哪些 VH 和 VL 链来自同一细胞的信息丢失, 因为细胞先进行裂解然后分别扩增 VH 和 VL 基因开发 MAF (见下图) 的目的是纠正 Ig-seq 中的扩增偏向性, 方法是在多重 PCR 扩增前和扩增期间使用唯一标识符 (UID) 标记, 并采用相应的生物信息学流程进行分析。



Rep-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">抗体频率测定准确度高达 99% | <ul style="list-style-type: none">数据分析较困难⁶²进行批量分析时, 关于哪些 V_H 和 V_L 链来源于同一细胞的信息缺失⁶¹ |

综述

Hackl H., Charoentong P., Finotello F. and Trajanoski Z. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions. *Nat Rev Genet.* 2016;17:441-458.

Hou X. L., Wang L., Ding Y. L., Xie Q. and Diao H. Y. Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire. *Genes Immun.* 2016;17:153-164.

Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014;32:158-168.

参考文献

Khan T. A., Friedensohn S., Gorter de Vries A. R., Straszewski J., Ruscheweyh H. J., et al. Accurate and predictive antibody repertoire profiling by molecular amplification fingerprinting. *Sci Adv.* 2016;2:e1501371.

该研究介绍了最初的 MAF 方法。作者发现了 MAF 偏向校正配合相应的生物信息学流程分析使抗体频率测定的准确度高达 99%。他们还用 MAF 校正 PCR 和测序误差, 可使全长度抗体多样性测定的误差修正比例达到 98-100%。

Illumina 技术: MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

59. Benichou J., Ben-Hamo R., Louzoun Y. and Efroni S. Rep-Seq: uncovering the immunological repertoire through next-generation sequencing. *Immunology.* 2012;135:183-191.

60. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H. and Quake S. R. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014;32:158-168.

61. Khan T. A., Friedensohn S., Gorter de Vries A. R., Straszewski J., Ruscheweyh H. J. and Reddy S. T. Accurate and predictive antibody repertoire profiling by molecular amplification fingerprinting. *Sci Adv.* 2016;2:e1501371.

62. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H. and Quake S. R. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014;32:158-168.

EC-seq: 切除环测序

EC-seq 可捕获并分析整个胸腺和脾组织范围内的免疫基因位点重排。

重组信号序列 (RSS) 位点处的双链断裂 (由重组激活的基因重组酶 (RAG) 介导) 要先于非同源末端连接 (NHEJ) 复合物所进行的基因组删除和末端加工。编码序列末端先通过共价键形成发卡状结构, 然后在连接前重新打开。切除环连接点从未处理的 DNA 末端连接并且几乎不进行任何修饰, 然后用于制备测序文库。



EC-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">可捕获并分析免疫基因位点重排 | <ul style="list-style-type: none">学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无

参考文献

Parkinson N. J., Roddis M., Ferneyhough B., et al. Violation of the 12/23 rule of genomic V(D)J recombination is common in lymphocytes. *Genome Res.* 2015;25:226-234.

作者开发了 EC-seq 来研究小鼠整个胸腺和脾组织内的 V(D)J 重组。他们发现生理条件下基因组重组的 12/23 规则屡屡被打破, 从而导致无法预期的杂交重组。这些非典型切除环会在抗原受体多样性形成阶段逸出。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Sample Prep Kit

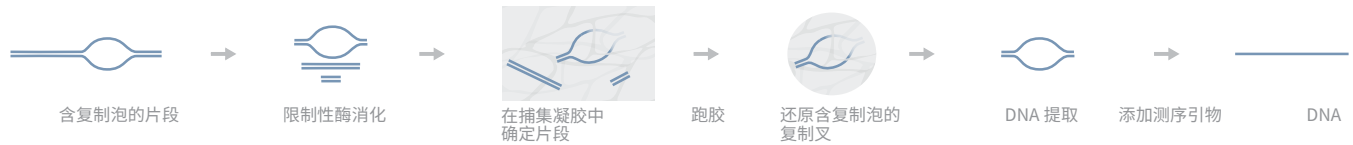
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Bubble-Seq: 含复制起始位点（复制泡）的限制性片段文库

Bubble-Seq 可在体内制备含复制起始位点（复制泡）的限制性片段文库⁶³。

该方法通过在 3' 端加生物素 -16-dUTP 对原始文库中的 DNA 进行生物素化。对生物素化的 DNA 进行超声处理，然后使用链霉亲和素包被的微珠捕获。游离 DNA 片段经过纯化后用于制备测序文库。



Bubble-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 方案简单 | <ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无

参考文献

Foulk M. S., Urban J. M., Casella C. and Gerbi S. A. Characterizing and controlling intrinsic biases of lambda exonuclease in nascent strand sequencing reveals phasing between nucleosomes and G-quadruplex motifs around a subset of human replication origins. *Genome Res.* 2015;25:725-735.

作者将 Bubble-Seq 用作正交分析技术以验证 G-四联体（G4）结构并非起点特化的常规决定因素，但可能对亚群起作用。

Illumina 技术：HiSeq 系统

Mukhopadhyay R., Lajugie J., Fourel N., et al. Allele-specific genome-wide profiling in human primary erythroblasts reveal replication program organization. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004319.

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

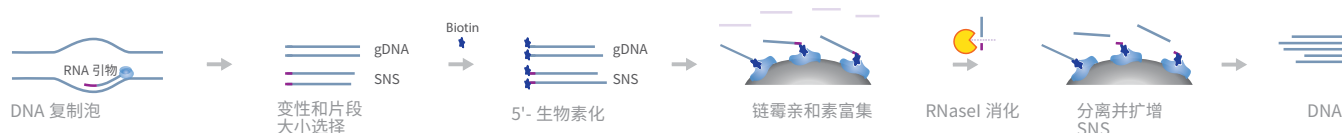
Nextera DNA Library Prep Kit

63. Mesner L. D., Valsakumar V., Cieslik M., Pickin R., Hamlin J. L. and Bekiranov S. Bubble-seq analysis of the human genome reveals distinct chromatin-mediated mechanisms for regulating early- and late-firing origins. *Genome Res.* 2013;23:1774-1788.

NSCR: 新生链捕获和释放

NSCR 可通过捕获属于单链 RNA-DNA 嵌合体的短新生链 (SNS) 实现 DNA 复制起点的分离和测序⁶⁴。简言之, NSCR 可捕获并纯化 RNA-DNA 嵌合性 SNS, 然后通过切掉起始位置的 RNA 引物部分末端的链来释放 DNA 部分。

首先, 使 gDNA 变性, 通过蔗糖密度梯度离心选择大小在 400–2000 bp 的片段, 然后进行 5'-生物素化。通过链霉亲和素分离生物素标记的片段, 从而实现了 SNS 和 gDNA 链的纯化。然后, 使用核糖核酸酶 I 将和单链 RNA-DNA 嵌合体前端的 RNA 引物结合的 DNA 分离出来。该过程可将 RNA 引物和 gDNA 留在链霉亲和素微珠上。然后对释放的新生 DNA 链进行扩增和测序。该方法是在广泛使用的基于 5- 溴脱氧尿嘧啶和 λ 核酸外切酶 (λ -exo) 的 SNS 纯化方法基础上改良得到的。



NSCR 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 定位基因组范围内的 DNA 复制起点• 新生链发现量高于 λ-exo 类方法 (峰数量: 2231 对 3922)• 核糖核酸酶 I 酶切时序列特异性极低• 适用于采用小 RNA 引物生成 RNA-DNA 嵌合体的系统 | <ul style="list-style-type: none">• 纯化回收率低于 10% (1 mg 总 DNA 得到 1–2 ng SNS)• 由于核糖核苷酸误参入 SNS 的 DNA 部分, 因此错误 read 数量可能会增加 |

综述

尚无

参考文献

Kunnev D., Freeland A., Qin M., Wang J. and Pruitt S. C. Isolation and sequencing of active origins of DNA replication by nascent strand capture and release (NSCR). *J Biol Methods*. 2015;2:

作者开发了 NSCR 来分离 SNS 并确定 DNA 复制起点的位置。他们对小鼠细胞系进行 NSCR 并得到了 3922 个 SNS 峰。与从前使用 λ -exo 类技术得到的 2231 个 SNS 峰相比, 这些峰有 79% 与之重叠。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

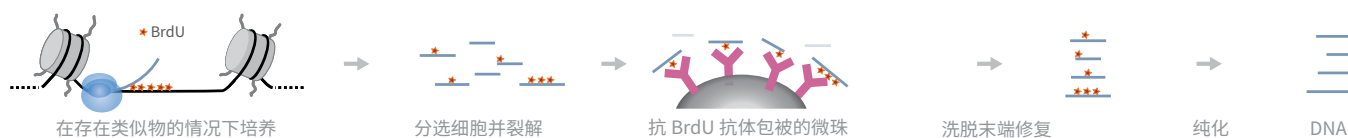
TruSeq ChIP Library Prep Kit

64. Kunnev D., Freeland A., Qin M., Wang J. and Pruitt S. C. Isolation and sequencing of active origins of DNA replication by nascent strand capture and release (NSCR). *J Biol Methods*. 2015;2:

Repli-Seq: 新生 DNA 复制链测序

Repli-Seq 可绘制整个基因组上新生 DNA 复制链的序列图谱（针对 6 个细胞周期阶段中的每一个阶段）⁶⁵。

该过程的实现方法是采用将胸腺嘧啶替换为 5- 溴脱氧尿嘧啶（BrdU）的培养基来培养细胞。采用流式细胞荧光分选（FACS）技术按细胞当前所处的细胞分裂状态进行细胞分选。带有 5- 溴脱氧尿嘧啶标记的 DNA 链与磁珠上的抗 5- 溴脱氧尿嘧啶抗体发生免疫沉淀反应。然后可按 TruSeq DNA 文库制备方案将上述经免疫沉淀得到的 DNA 链制备成测序文库。



Repli-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">可按细胞分裂阶段绘制新复制 DNA 的序列图谱样本起始量要求低（5000 个细胞），因此适用于稀有细胞群研究DNA 文库制备步骤精简 | <ul style="list-style-type: none">受限于细胞培养及其他人工系统（原因是当存在带标记核苷酸时对孵育会有所要求）。 |

综述

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015;58:586-597.

参考文献

Ohbayashi R., Watanabe S., Ehira S., et al. Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. *ISME J*. 2015;.

作者研究了原核生物中高度保守的 DNA 复制起始因子 DnaA 的重要性。他们利用 Repli-Seq 确定 DnaA 破坏株（细长聚球藻）的复制起始位点。结果表明 dnaA 基因的删除对模式生物的 DNA 复制或细胞生长没有影响。研究人员得出的结论是一些蓝藻品系在多样化进程中失去了对 DnaA 的功能依赖性。

Illumina 技术：Genome Analyzer 系统

Deyle D. R., Hansen R. S., Cornea A. M., et al. A genome-wide map of adeno-associated virus-mediated human gene targeting. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21:969-975.

Barlow J. H., Faryabi R. B., Callen E., et al. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*. 2013;152:620-632.

相关试剂盒

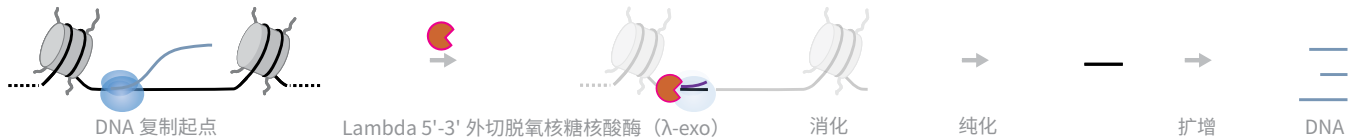
TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

65. Hansen R. S., Thomas S., Sandstrom R., et al. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:139-144.

NS-Seq: 新生链测序

NS-Seq 可通过对新生 DNA 链进行测序来确定 DNA 复制起点在基因组中的位置。NS-Seq 利用 λ -exo 在有效消化亲代 DNA 的同时, 可使 RNA 引物所保护的新生链得以完整保留。但 λ -exo 不能有效消化 G- 四联体结构 (G4) 和 GC 含量丰富的序列; 该偏向性可通过使用来自非复制型细胞的经 λ -exo 消化的 DNA 作为对照来归一化⁶⁶。

在该方法中, 对 gDNA 进行富集、单链处理以及基于 T4 PNK 的 5' 端磷酸化。下一步, 使用 λ -exo 消化 DNA, 然后进行纯化。用随机六聚体引物将得到的单链新生链转换为双链 DNA, 然后使其片段化至 100–600 bp。使用标准试剂盒制备 DNA 文库, 然后进行测序。



NS-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够通过对 RNA 引物保护的新生 DNA 链进行测序确定 DNA 复制起点。• 非复制期细胞中的 DNA 经 λ-exo 消化可作为对照用于将 λ-exo 消化的偏向性归一化。• λ-exo 消化过程中用 Na^+ 替代 K^+ 可缓解 G4 区域消化效率低的问题。 | <ul style="list-style-type: none">• λ-exo 不能有效消化质粒中的 G4 结构并且会在富含 GC 的序列处停止。• 纯化后的样本可能会被 GC 含量高且受 G4 保护的 DNA 污染。 |

综述

MacAlpine D. M. ORChestrating the human DNA replication program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:9136-9138.

Song J., Perreault J.-P., Topisirovic I. and Richard S. RNA G-quadruplexes and their potential regulatory roles in translation. *Translation*. 2016;4:e1244031.

参考文献

Smith O. K., Kim R., Fu H., et al. Distinct epigenetic features of differentiation-regulated replication origins. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:18.

该研究探索了 DNA 复制起点与转录组变化间的关系, 尤其是针对人类致癌细胞系。作者对经过 λ -exo 消化和 5- 溴脱氧尿嘧啶替换分离的短新生链进行了 NS-Seq 测序。他们发现, 复制起点的分布在癌细胞和非癌细胞中非常接近。通过 NS-Seq 数据, 他们发现具有细胞类型特异性的复制起点仅在 S 期后期发生复制, 而共用起点在整个 S 期均发生复制。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq SBS Kit v3

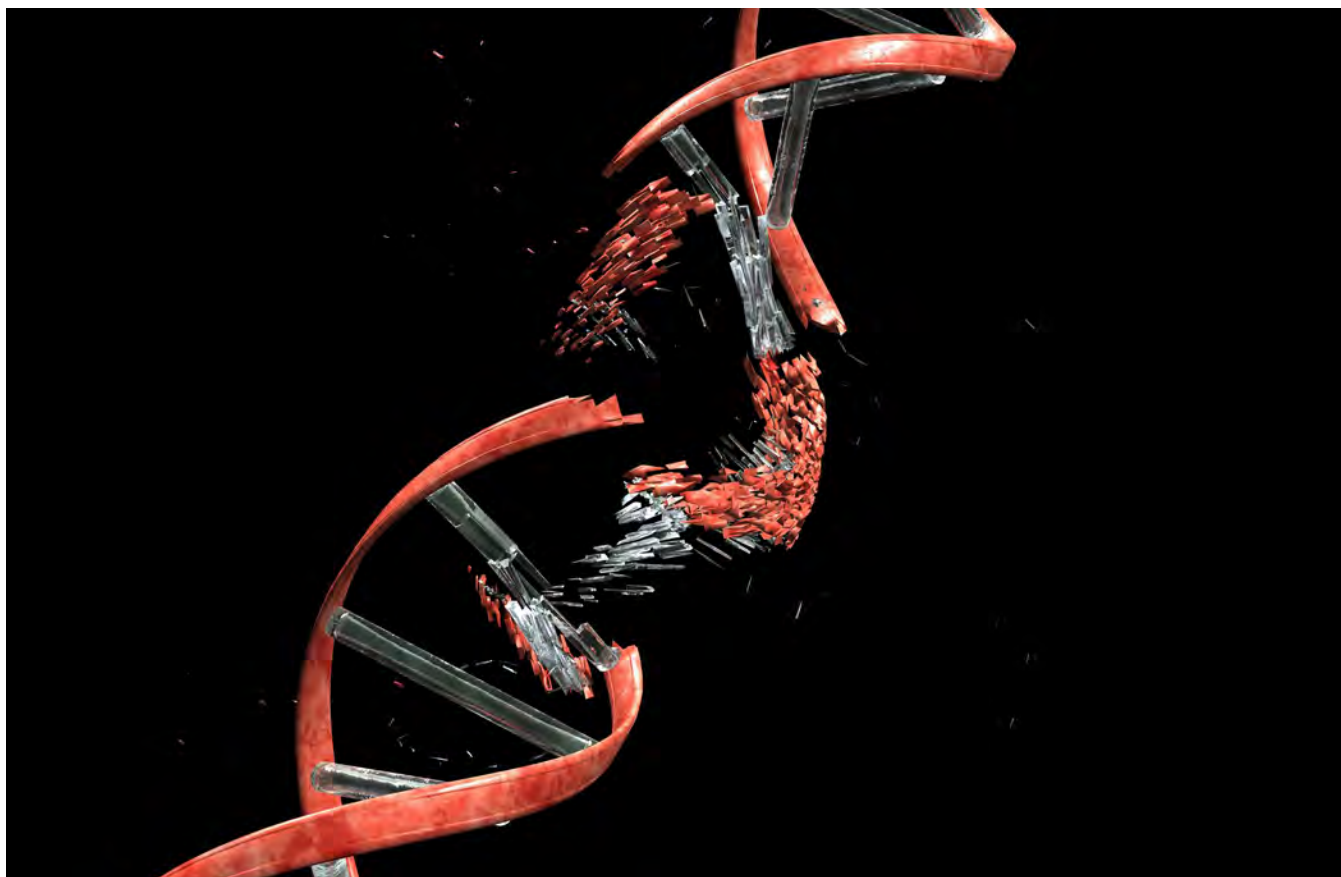
相关试剂盒

TruSeq SBS Kit v3

66. Foulk M. S., Urban J. M., Casella C. and Gerbi S. A. Characterizing and controlling intrinsic biases of lambda exonuclease in nascent strand sequencing reveals phasing between nucleosomes and G-quadruplex motifs around a subset of human replication origins. *Genome Res*. 2015;25:725-735.

DNA 断裂定位

多种生物学过程都会发生 DNA 链断裂的情况，例如转录和淋巴细胞内抗原受体多样化生成。⁶⁷ 上述断裂是癌症相关易位、缺失和扩增发生的重要基础。^{68,69} 随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的出现，研究人员们对确定切割的靶位点及脱靶位点的特征重新燃起了兴趣。⁷⁰



对 DNA 链断裂的准确判断主要用于癌症研究和 CRISPR 介导的基因编辑研究。

综述

Kim D., Kim S., Kim S., Park J. and Kim J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.

Lee C. M., Cradick T. J., Fine E. J. and Bao G. Nuclease Target Site Selection for Maximizing On-target Activity and Minimizing Off-target Effects in Genome Editing. *Mol Ther.* 2016;24:475-487.

Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W., et al. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

67. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

68. Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell.* 2010;141:27-38.

69. Alt F. W., Zhang Y., Meng F. L., Guo C. and Schwer B. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell.* 2013;152:417-429.

70. Kim D., Kim S., Kim S., Park J. and Kim J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.

定位 DNA 单链断裂 (SSB-Seq)

SSB-Seq⁷¹ 可在基因组范围内实现 DNA 单链断裂 (SSB) 的体内定位。

在该方法中，先分离 gDNA，然后在脱氧核苷三磷酸 (dNTP)（包括异羟甲基地黄毒甙标记的 dUTP 和少量双脱氧核苷酸）存在的条件下使用 DNA 聚合酶 I 对 gDNA 进行切口平移。剪切 DNA，用抗异羟甲基地黄毒甙抗体与带有标记的片段发生免疫沉淀反应，然后纯化片段制备测序文库。



SSB-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 方案简单 | <ul style="list-style-type: none">• 无法准确确定断裂位置• 学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无

参考文献

Baranello L., Kouzine F., Wojtowicz D., Cui K., Przytycka T. M., et al. DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13111-13122.

该研究介绍了最初的 SSB-Seq 方案。作者以人结肠癌细胞为对象测试了该方法，并使用拓扑异构酶 II (Top2) 抑制剂依托泊苷 (ETO) 对结果进行了验证。ETO 处理与断裂定位技术联用似乎是阐释整个基因组 Top2 酶活性模式的有力方法。

Illumina 技术: Genome Analyzer 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

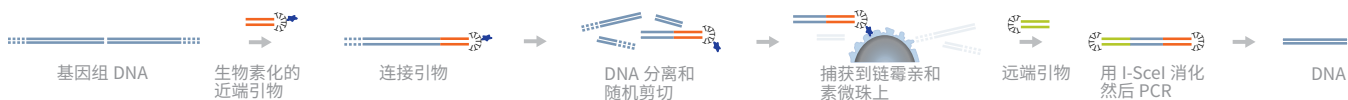
Nextera DNA Library Prep Kit

71. Baranello L., Kouzine F., Wojtowicz D., et al. DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13111-13122.

BLESS: 通过链霉亲和素标记和富集断裂片段并测序

BLESS 是基因组水平的 DSB 定位方法（核苷酸级分辨率）⁷²。BLESS 能够检测端粒末端、Sce 核酸内切酶诱导的 DSB 以及基因组范围内复杂的 DSB 情况。

在该方法中，先使 DSB 与共价连接有生物素的近端接头进行原位连接。提取 gDNA 并将其片段化，再用链霉亲和素微珠捕获带有标记的片段。然后将远端接头连接至所捕获片段的游离端。使用 I-SceI 消化接头以释放片段，之后对其进行 PCR 扩增。



BLESS 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• DSB 的检测可达到核苷酸级分辨率• 不依赖与 DSB 结合的蛋白（会产生偏向性）• 不依赖单链 DNA（ssDNA）（会产生偏向性） | <ul style="list-style-type: none">• 背景较高；只能定位未结合末端⁷³• 易受细胞固定相关杂峰的影响⁷⁴ |

综述

Lee C. M., Cradick T. J., Fine E. J. and Bao G. Nuclease Target Site Selection for Maximizing On-target Activity and Minimizing Off-target Effects in Genome Editing. *Mol Ther.* 2016;24:475-487.

参考文献

Ran F. A., Cong L., Yan W. X., et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015;520:186-191.

作者利用 BLESS 捕获了细胞中 Cas9 诱导的 DNA DSB 的瞬态信息。他们能够确定之前无法通过靶序列相似度法或染色质免疫沉淀（ChIP）确定的脱靶位点。

Illumina 技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit

72. Crosetto N., Mitra A., Silva M. J., et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods.* 2013;10:361-365.

73. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

74. Tsai S. Q., Zheng Z., Nguyen N. T., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.

DSB-Seq：定位 DNA 双链断裂

DSB-Seq 可在基因组范围内定位体内 DNA DSB⁷⁵。

该方法使用生物素 -16-dUTP 通过 3' 端连接反应对 DNA 进行生物素化。对生物素化的 DNA 进行超声处理，然后使用链霉亲和素包被的微珠捕获。游离 DNA 片段经过纯化后用于制备测序文库。



DSB-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 方案简单 | <ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无。

参考文献

Baranello L., Kouzine F., Wojtowicz D., Cui K., Przytycka T. M., et al. DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13111-13122.

该研究介绍了最初的 DSB-Seq 方案。作者以人结肠癌细胞为对象测试了该方法，并使用 Top2 抑制剂 ETO 对结果进行了验证。ETO 处理与断裂定位技术联用似乎对阐释 Top2 酶在基因组范围内的活性非常有效。

Illumina 技术：Genome Analyzer

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

75. Baranello L., Kouzine F., Wojtowicz D., et al. DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13111-13122.

Break-seq: 双链断裂标记

Break-seq 将 DSB 标记与 NGS 联用共同定位染色体断裂位置，其灵敏度和分辨率均有所提升⁷⁶。

对琼脂糖凝胶中捕获的 DNA 进行末端修复，然后用生物素对其进行标记。然后用 β - 琼脂糖酶消化琼脂糖凝胶，之后进行 DNA 稀释和片段化。纯化片段化 DNA，再用未经修饰的 dNTP 进行末端修复，然后加 A 尾。片段经磁珠纯化后进行 PCR 扩增、纯化，用于制备测序文库。



Break-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 方案简单 | <ul style="list-style-type: none">• 未在其他实验室中重现 |

综述

尚无。

参考文献

Hoffman E. A., McCulley A., Haarer B., Arnak R. and Feng W. Break-seq reveals hydroxyurea-induced chromosome fragility as a result of unscheduled conflict between DNA replication and transcription. *Genome Res.* 2015;25:402-412.

作者利用 Break-seq 证明了 DSB 优先发生于经酵母细胞中羟基脲 (HU) 转录诱导的基因上。值得注意的是，在检查点突变体 *mec1* 和 *MEC1* 细胞中，HU 诱导基因的不同子集发生了 DSB。作者得出结论，在细胞消除 HU 所产生影响的过程中，*MEC1* 细胞中复制叉走过的距离比在 *mec1* 细胞中更大。

Illumina 技术: MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

76. Hoffman E. A., McCulley A., Haarer B., Arnak R. and Feng W. Break-seq reveals hydroxyurea-induced chromosome fragility as a result of unscheduled conflict between DNA replication and transcription. *Genome Res.* 2015;25:402-412.

GUIDE-seq: 基于测序的基因组水平无偏向性 DSB 鉴定

GUIDE-seq⁷⁷ 原理是将双链寡脱氧核苷酸 (DSO) 整合到 DSB 中。该方法属于用于检测 CRISPR/Cas9 及其他 RNA 引导性核酸酶 (RGN) 脱靶效应的一类方法 (例如 HTGTS⁷⁸、LAM-HTGTS⁷⁹ 和 Digenome-seq⁸⁰)。

通过将平末端 DSO 整合到人类活体细胞基因组中来标记 RGN 诱导的 DSB。利用无偏向性的扩增和 NGS 从核苷酸水平上准确定位基因组中的 DSO 整合位点。



GUIDE-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">可在活体人类细胞中确定 RGN 的全局特异性信息靶向测序可节省费用 | <ul style="list-style-type: none">会丢失部分靶标⁸¹ |

综述

Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W., et al. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

Lee C. M., Cradick T. J., Fine E. J. and Bao G. Nuclease Target Site Selection for Maximizing On-target Activity and Minimizing Off-target Effects in Genome Editing. *Mol Ther.* 2016;24:475-487.

参考文献

Kleinstiver B. P., Tsai S. Q., Prew M. S., et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;

作者发现氨基酸球菌属 Cpf1 核酸酶 (AsCpf1) 和毛螺菌科 Cpf1 核酸酶 (LbCpf1) 对人类细胞的靶标位点编辑准确性与酿脓链球菌 Cas9 的编辑准确性相当。他们通过对两种核酸酶进行 GUIDE-seq 和靶向深度测序分析, 发现使用的大部分 crRNA 未出现脱靶效应, 这表明 AsCpf1 和 LpCpf1 对人类细胞具有高度特异性。

illumina 技术: MiSeq 系统

Kleinstiver B. P., Pattanayak V., Prew M. S., et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529:490-495.

在本研究中, 作者构建并研究了 15 种 SpCas9 突变体, 所有突变体均发生了 4 种替代突变 (N497A、R661A、Q695A 和 Q926A) 中的 1-4 种。他们通过检测靶向增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的单向 RNA (sgRNA), 确定了四重突变体 (称为 SpCas9-HFI) 是能够降低非特异性 DNA 结合的高保真度突变体。在对人类细胞的测试中, 85% 以上的 sgRNA 使 SpCas9-HFI 保留了野生型 SpCas9 的靶定活性。在 sgRNA 靶定非重复序列的情况下, 采用 GUIDE-seq 和靶向深度测序测 Cas9-HFI 时没有或几乎没有可检出的脱靶事件。即使是非典型重复性靶向位点, 在使用 SpCas9-HFI 时也未检出绝大多数野生型 SpCas9 诱导的脱靶突变。

illumina 技术: MiSeq 系统

77. Tsai S. Q., Zheng Z., Nguyen N. T., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.

78. Chiarle R., Zhang Y., Frock R. L., et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell.* 2011;147:107-119.

79. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

80. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.

81. Kim D., Kim S., Kim S., Park J. and Kim J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.

Yin H., Song C. Q., Dorkin J. R., et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2016;34:328-333.

在本研究中，作者将脂质纳米粒介导的 Cas9 mRNA 递送与腺相关病毒（AAV）联用，在人类酪氨酸血症小鼠模型中编码了一个 sgRNA 和一个修复模板。他们证明该处理通过修正致病的 Fah- 剪接突变产生了延胡索酰乙酰乙酸水解酶（Fah）- 阳性的肝细胞。他们对培养的肝细胞进行 GUIDE-seq，并使用靶向测序检查脱靶效应，发现该方法的体内脱靶率较低。

Illumina 技术：NextSeq 500 系统、MiSeq 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

Bolukbasi M. F., Gupta A., Oikemus S., et al. DNA-binding-domain fusions enhance the targeting range and precision of Cas9. *Nat Methods.* 2015; 12:1150-1156.

为提升 Cas9 的编辑精度，作者向 Cas9 中融合了一个可控的 DNA 结合域（pDBD）并降低了 Cas9 本身的 DNA 结合亲和力。他们采用的是 GUIDE-seq 并发现 Cas9-pDBD 嵌合体能够大幅提升基因编辑精度，从而得到了一套可高精度编辑基因组的灵活系统。

Illumina 技术：MiSeq 系统、TruSeq DNA Library Prep Kit

Friedland A. E., Baral R., Singhal P., et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol.* 2015;16:257.

作者利用 GUIDE-seq 和脱靶位点已知的导向 RNA（gRNA）比较了金黄色葡萄球菌 Cas9（SaCas9）与酿脓链球菌 Cas9（SpCas9）的特异性。SpCas9 脱靶位点大多可重现。经比较，SaCas9 测得的靶向 reads 很高而脱靶的 reads 仅为个位数。

Illumina 技术：MiSeq 系统

Kleinstiver B. P., Prew M. S., Tsai S. Q., et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1293-1298.

研究人员利用 GUIDE-seq 研究野生型 SaCas9 和一系列经前间区序列邻近基序（protospacer adjacent motif, PAM）修饰的突变体的基因编辑特异性。其中一个突变体（称为 KKH）表现出了强大的基因组编辑活性，并将 SaCas9 靶定范围增加了 2-4 倍。在人类细胞中，野生型和 KKH SaCas9 诱导的脱靶效应数量相当。

Illumina 技术：MiSeq 系统

Doench J. G., Fusi N., Sullender M., et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:184-191.

Yin H., Song C. Q., Dorkin J. R., Zhu L. J., Li Y., et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2016;34:328-333.

Chari R., Mali P., Moosburner M. and Church G. M. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nat Methods.* 2015;12:823-826.

Kleinstiver B. P., Prew M. S., Tsai S. Q., et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* 2015;523:481-485.

相关试剂盒

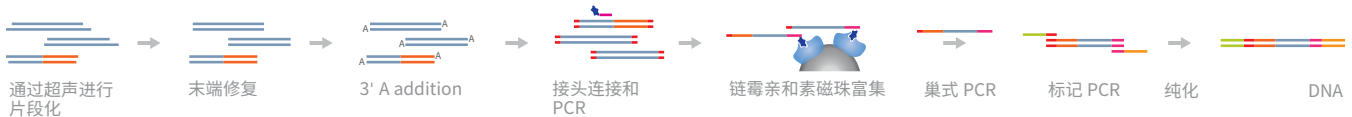
TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

HTGTS: 高通量全基因组易位测序

HTGTS 开发用于研究哺乳动物细胞中的易位机制⁸²。该方法非常适用于研究 AID 依赖型 IgH 类别转换 (HTGTS-Rep-seq)⁸³ 以及 CRISPR/Cas9 基因组修饰⁸⁴。

在 HTGTS-Rep-seq 方法中, 先超声处理 B 细胞群的基因组 DNA, 然后用生物素化的引物 (可与 J 基因片段下游退火结合) 进行线性扩增。用链霉亲和素微珠富集带有生物素标记的单链 DNA 产物, 然后在 3' 端连接一个含 6-核苷酸 UMI 的桥式接头。



HTGTS-Rep-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">效率远高于全基因组测序 | <ul style="list-style-type: none">会低估 DSB 频率⁸⁵受限于染色质的可及性⁸⁶ |

综述

尚无。

参考文献

Schwer B., Wei P. C., Chang A. N., et al. Transcription-associated processes cause DNA double-strand breaks and translocations in neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:2258-2263.

作者希望利用 HTGTS 确定转录起始位点 (TSS) (已通过对原代神经干细胞 / 祖细胞 (NSPC) 的整体测序分析确定其处于激活状态) 附近是否存在大量断裂接合点。结果表明, NSPC 中所有含易位接合点的活跃转录的基因中, 与 TSS 的距离小于 2 kb 的, 其转录速率 (平均) 明显高于与 TSS 的距离大于 2 kb 的基因。

Illumina 技术: MiSeq 系统

Frock R. L., Hu J., Meyers R. M., et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*. 2015;33:179-186.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

82. Chiarle R., Zhang Y., Frock R. L., et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*. 2011;147:107-119.

83. Lin S. G., Ba Z., Du Z., Zhang Y., Hu J. and Alt F. W. Highly sensitive and unbiased approach for elucidating antibody repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:7846-7851.

84. Mei Y., Wang Y., Chen H., Sun Z. S. and Ju X. D. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics*. 2016;43:63-75.

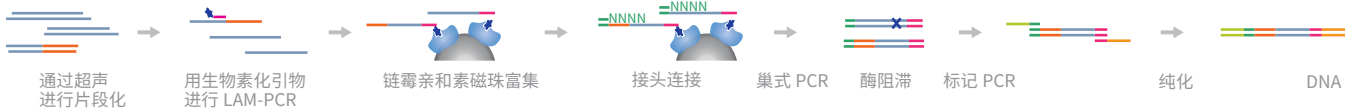
85. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc*. 2016;11:853-871.

86. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*. 2015;12:237-243, 231 p following 243.

LAM-HTGTS: 线性扩增介导的高通量基因组范围测序

LAM-HTGTST 通过将断裂点易位至所培养哺乳动物细胞上固定的“诱饵”DSB 上的方法用于在基因组范围内检测“目标”DSB (double-stranded breaks)。⁸⁷ 分离的 gDNA 直接通过 LAM-PCR 克隆得到诱饵 - 目标连接体，并与桥式接头单向连接。后续 PCR 步骤将扩增出单链 DNA 连接体文库以用于测序。

LAM-HTGT 示意图。



综述

尚无。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">灵敏检测染色体内的 DSB | <ul style="list-style-type: none">不适用于样本量有限的分析材料 |

参考文献

Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W., et al. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

作者利用 LAM-HTGTS 研究重组激活基因 (RAG) 核酸内切酶在 V(D)J 重组期间的中靶和脱靶活性 (以 RAG 生成的内源性 DSB 作为诱饵)。尽管之前的研究检测出仅存在少量脱靶 RAG 生成的 DSB，但 LAM-HTGTS 研究却鉴定出数千个 RAG 脱靶位点 (严格限定于染色体环区域内)。该结果表明线性 RAG 跟踪模型能够解释大部分 RAG 脱靶事件的发生。

Illumina 技术: MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

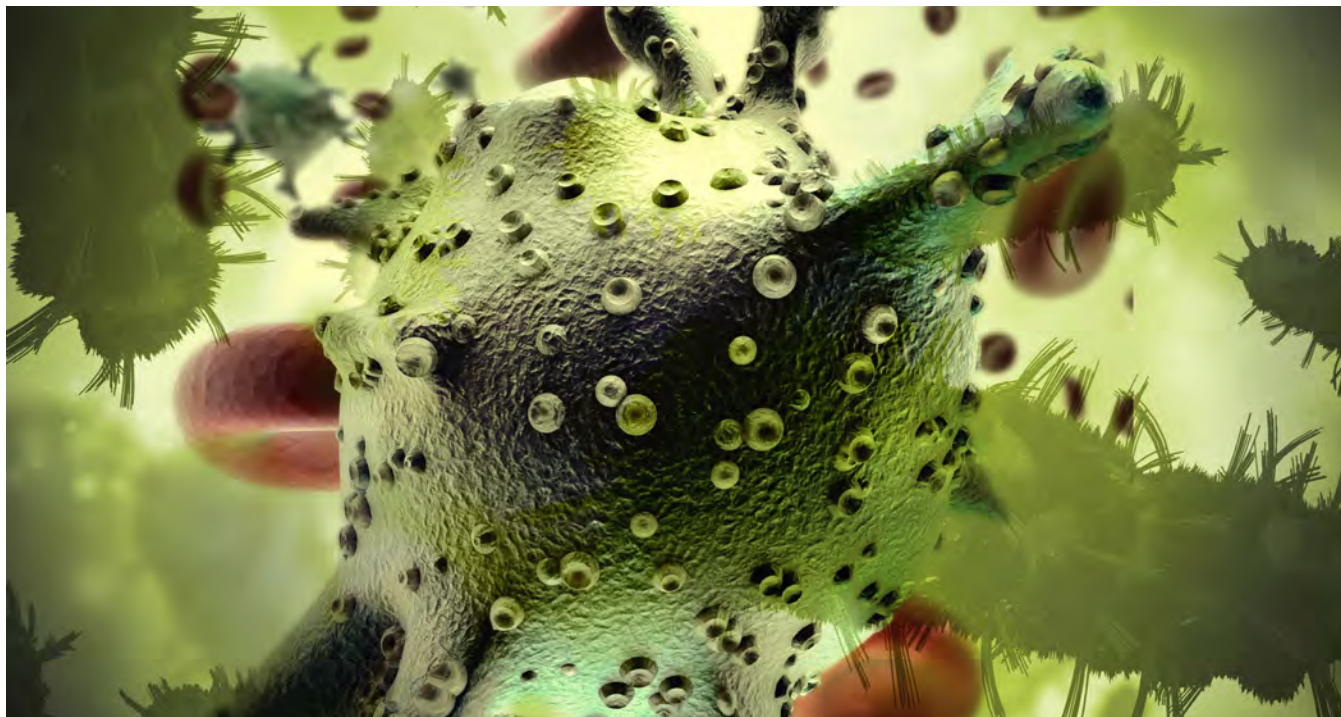
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

87. Hu J., Meyers R. M., Dong J., Panchakshari R. A., Alt F. W. and Frock R. L. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:853-871.

低水平 DNA 检测

单细胞基因组学可用于识别和研究循环肿瘤细胞、游离 DNA、微生物以及不可培养微生物。此外，还可用于辅助胚胎植入前诊断，并帮助我们更好地了解组织特异性细胞分化。^{88,89} 细胞分裂期间的 DNA 复制并不完美。细胞内会逐渐累积独有的体细胞突变。所以体内每个细胞都具有独特的“基因组签名”，因此我们可以实现细胞谱系树的高精度重建。⁹⁰ 这些细胞谱系树可预测是否存在少量干细胞。该信息对于从癌症发展^{91,92} 到胚胎植入前基因诊断^{93,94} 的各个领域均非常有价值。



单细胞基因组学有助于确定和识别循环肿瘤细胞和微生物。

综述

Gawad C., Koh W. and Quake S. R. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet.* 2016;17:175-188.

Huang L., Ma F., Chapman A., Lu S. and Xie X. S. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:79-102.

Voet T. and Van Loo P. SNES makes sense? Single-cell exome sequencing evolves. *Genome Biol.* 2015;16:86.

Wang Y. and Navin N. E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609.

88. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet.* 2013;14:618-630.

89. Blainey P. C. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37:407-427.

90. Frumkin D., Wasserstrom A., Kaplan S., Feige U. and Shapiro E. Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol.* 2005;1:e50.

91. Navin N., Kendall J., Troge J., et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature.* 2011;472:90-94.

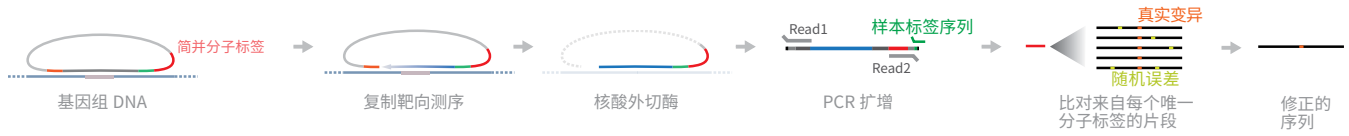
92. Potter N. E., Ermini L., Papaemmanuil E., et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res.* 2013;23:2115-2125.

93. Van der Aa N., Esteki M. Z., Vermeesch J. R. and Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med.* 2013;5:71.

94. Hou Y., Fan W., Yan L., et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell.* 2013;155:1492-1506.

smMIP: 单分子分子倒置探针

smMIP 方法利用单分子标记和分子倒置探针来检测并定量低频遗传变异。⁹⁵ 在该方法中, 探针用于检测 gDNA 中的目标基因。探针目标基因复制完成后进行核酸外切酶消化, 留下带有标签的目标基因, 然后对该部分进行 PCR 扩增。测序完成后可得到目标基因的高分辨率测序 read, 而测序深度越大各独有分子标签的比对效果越好。



smMIP 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可检测低频目标基因• 可实现单细胞测序或对起始材料有限的样本进行测序• 临床样本测序结果中单碱基的错误率为 $2.6 \times 10^{-5.96}$ | <ul style="list-style-type: none">• PCR 扩增出错• PCR 偏向会导致 GC 含量丰富的模板表达不足。• PCR 过程中聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的基因 |

综述

Eboreime J., Choi S. K., Yoon S. R., Arnheim N. and Calabrese P. Estimating Exceptionally Rare Germline and Somatic Mutation Frequencies via Next Generation Sequencing. *PLoS One*. 2016;11:e0158340.

参考文献

Luks V. L., Kamitaki N., Vivero M. P., et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr*. 2015;166:1048-1054 e1041-1045.

为检测体细胞磷脂酰肌醇 4,5- 双磷酸 3 激酶催化亚基 α 基因 (PIK3CA) 突变在患者 (包括独立的淋巴管畸形 (LM) 和静脉畸形骨肥大综合征 (KTS)) 体内是否更常见, 作者对患有上述疾病的患者小群体进行了筛查。8 名患者中, 采用全外显子组测序、靶向捕获测序以及微滴式数字聚合酶链式反应 (ddPCR) 均未检出 PIK3CA 突变。研究人员利用 smMIP 筛查整个 PIK3CA 编码序列是否存在新突变。他们发现了 8 个受试组织样本中有 4 个出现疑似的致病性 PIK3CA 突变, 其突变的等位基因频率范围为 2.8% (8/275) 至 37.5% (314/837)。

Illumina 技术: MiSeq 系统

Mirzaa G. M., Conti V., Timms A. E., et al. Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, PIK3R2, in perisylvian polymicrogyria: a next-generation sequencing study. *Lancet Neurol*. 2015;14:1182-1195.

本研究旨在确定导致双侧外侧裂多小脑回 (bilateral perisylvian polymicrogyria, BPP) 疾病的遗传因素, 以及其在人群中出现的频率。研究人员以 38 名 BPP 患者 (头部尺寸从正常到较大) 为研究对象, 采用 smMIP 对整个 PIK3R2 基因进行靶向测序。他们发现有 17 名儿童存在原发性的 PIK3R2 嵌合突变。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Carlson K. D., Sudmant P. H., Press M. O., et al. MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals.

95. Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O'Roak B. J. and Shendure J. Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res*. 2013;23:843-854.
96. Eboreime J., Choi S. K., Yoon S. R., Arnheim N. and Calabrese P. Estimating Exceptionally Rare Germline and Somatic Mutation Frequencies via Next Generation Sequencing. *PLoS One*. 2016;11:e0158340.

Genome Res. 2015;25:750-761.

Carvill G. L., McMahon J. M., Schneider A., et al. Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *Am J Hum Genet.* 2015;96:808-815.

Kang H. C., Baek S. T., Song S. and Gleeson J. G. Clinical and Genetic Aspects of the Segmental Overgrowth Spectrum Due to Somatic Mutations in PIK3CA. *J Pediatr.* 2015;167:957-962.

Weren R. D., Ligtenberg M. J., Kets C. M., et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47:668-671.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

MIPSTR: 基于 smMIP 的 STR 位点靶向捕获

MIPSTR 方法用于对多个个体的遗传的和体细胞的短串联重复序列 (STR) 变异进行多重基因分型。⁹⁷ 该方法是 smMIP⁹⁸ 方法的变型, 但采用了全新的定位策略。

该方法利用 smMIP 探针的骨架: 包括 PCR 引物、测序接头、12 个碱基的简并标签和带有位点特异性序列和 STR- 侧翼序列的靶向臂。在具有遗传多样性的个体间捕获到的序列可鉴定出遗传的 STR 变异。简并标签标识的是测序引入的变异, 而标签定义的 read 组范围内的 STR 变异则认为是体细胞变异。



MIPSTR 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够区分技术误差与体细胞 STR 突变 | <ul style="list-style-type: none">• 需要高质量的参考基因组 |

综述

Estivill X. Genetic variation and alternative splicing. Nat Biotechnol. 2015;33:357-359.

参考文献

Carlson K. D., Sudmant P. H., Press M. O., Eichler E. E., Shendure J., et al. MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals. *Genome Res.* 2015;25:750-761.

作者利用 MIPSTR 确定不同拟南芥种群中 102 个 STR 基因位点的 STR 基因型。他们证明通过与预测 STR 变异的偏差以及与数量性状的关联可以识别出可能的功能性 STR。他们还利用混合的 DNA 检测实验 (带有 DNA 修复相关突变缺陷) 来证明 MIPSTR 能够检测出低频体细胞 STR 变异。

Illumina 技术: MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

97. Carlson K. D., Sudmant P. H., Press M. O., Eichler E. E., Shendure J. and Queitsch C. MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals. *Genome Res.* 2015;25:750-761.

98. Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O'Roak B. J. and Shendure J. Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res.* 2013;23:843-854.

MDA: 多重置换扩增技术

MDA 是微生物基因组测序的常用方法，因为该方法能够扩增大于 0.5 Mbp 的模板，但该方法也可以用于研究其他大小的基因组。⁹⁹

在该方法中，用 3' 端封闭的随机六聚体引物与模板杂交，然后使用 Phi 29 聚合酶进行链置换 DNA 合成。该方法可高效、快速完成 DNA 扩增。对扩增后的 DNA 进行深度测序可得到准确的 read，而测序深度越大，序列的比对和一致性分析结果越好。

现已基于最初的 MDA 方法开发出了多种方法（例如 MIDAS¹⁰⁰、ddMDA¹⁰¹、SNES¹⁰² 和 IMS-MDA¹⁰³），以改善扩增偏向性问题并提高通量。¹⁰⁴



MDA 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">模板可以是环状 DNA（例如质粒、细菌 DNA）可对大型模板进行测序可实现单细胞测序或对起始材料有限的样本进行测序 | <ul style="list-style-type: none">扩增偏向性强；基因组覆盖度最低约为 6%¹⁰⁵PCR 偏向会导致高 GC 含量的模板比例偏低。试剂污染会影响结果¹⁰⁶ |

综述

Sauvage V. and Eloit M. Viral metagenomics and blood safety. *Transfus Clin Biol.* 2016;23:28-38.

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Hou Y., Wu K., Shi X., et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience.* 2015;4:37.

Wang Y. and Navin N. E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609.

参考文献

Newton I. L., Clark M. E., Kent B. N., et al. Comparative Genomics of Two Closely Related *Wolbachia* with Different Reproductive Effects on Hosts. *Genome Biol Evol.* 2016;8:1526-1542.

作者比较了 2 种非常相似的沃巴赫氏菌菌株（基因组范围内存在 0.57% 同义的遗传分化）的基因组，他们对宿主的生殖危害不同。wVita 会诱导拟寄生物（丽蝇蛹集金小蜂）精卵不相容（又称细胞质不相容），而 wUni 则是导致另一种拟寄生物（赤眼蜂科）孤雌发育。作者对两种菌株的 DNA 均进行了 MDA 分析。他们鉴定出 wUni 类群中丢失或假基因化的一组基因会使其表型从细胞质不相容变为诱导孤雌生殖。

Illumina 技术：Genome Analyzer 系统

99. Dean F. B., Nelson J. R., Giesler T. L. and Lasken R. S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11:1095-1099.
100. Gole J., Gore A., Richards A., et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:1126-1132.
101. Rhee M., Light Y. K., Meagher R. J. and Singh A. K. Digital Droplet Multiple Displacement Amplification (ddMDA) for Whole Genome Sequencing of Limited DNA Samples. *PLoS One.* 2016;11:e0153699.
102. Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.
103. Seth-Smith H. M., Harris S. R., Scott P., et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nat Protoc.* 2013;8:2404-2412.
104. Seth-Smith H. M., Harris S. R., Scott P., et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nat Protoc.* 2013;8:2404-2412.
105. Navin N., Kendall J., Troge J., et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature.* 2011;472:90-94.
106. Woyke T., Sczyrba A., Lee J., et al. Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification. *PLoS One.* 2011;6:e26161.

Salman V, Berben T, Bowers R. M., et al. Insights into the single cell draft genome of "Candidatus Achromatium palustre". *Stand Genomic Sci.* 2016;11:28. Achromatium palustre (暂定种) 属于大型硫细菌, 该类细菌可生长至 100 μm 大小并在细胞内存储单质硫 (S₀)。无色硫杆菌属 (Achromatium spp.) 的独有特征是可大量积累胶状方解石 (CaCO₃) 内含物。所有无色硫杆菌属都无法培养。作者通过 MDA 和测序绘制了完成度 83% 的 Achromatium palustre (暂定种) 细胞基因组草图。

illumina 技术: MiSeq 系统

Troell K., Hallstrom B., Divne A. M., et al. Cryptosporidium as a testbed for single cell genome characterization of unicellular eukaryotes. *BMC Genomics.* 2016;17:471.

为探索单细胞基因组学方法在揭示受隐孢子虫感染宿主临床样本中基因组水平变异方面的潜在应用, 作者提取出各样本中的卵囊进行了后续的 MDA 和全基因组测序。该基因组学工作流程从粪便样本开始, 成功率 80%, 基因组覆盖率 81%。

illumina 技术: MiSeq 系统

Ning L., Li Z., Wang G., et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2015;5:11415.

在本研究中, 作者比较了 MDA、多次退火环状循环扩增技术 (MALBAC) 以及 GenomePlex 扩增方法在单个海马神经元测序方面的应用。他们用上述方法扩增单个海马神经元中的 gDNA, 然后使用 HiSeq 2000 系统进行低深度测序。其结果表明 MALBAC 和 GenomePlex 方法的单细胞测序结果的重现性和成功率高。MALBAC 确实存在明显的 GC 偏向性问题, 但可通过生物信息学工具解决。总体而言, 作者认为 MALBAC 和 GenomePlex 在 CNV 检测方面的性能优于 MDA。

illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Brito I. L., Yilmaz S., Huang K., et al. Mobile genes in the human microbiome are structured from global to individual scales. *Nature.* 2016;535:435-439.

Eloe-Fadrosh E. A., Paez-Espino D., Jarett J., et al. Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate phylum in geothermal springs. *Nat Commun.* 2016;7:10476.

Hatzenpichler R., Connon S. A., Goudeau D., et al. Visualizing *in situ* translational activity for identifying and sorting slow-growing archaeal-bacterial consortia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E4069-4078.

Moutailler S., Popovici I., Devillers E., Vayssier-Taussat M. and Eloit M. Diversity of viruses in Ixodes ricinus, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus. *New Microbes New Infect.* 2016;11:71-81.

Ottolini C. S., Capalbo A., Newnham L., et al. Generation of meiomaps of genome-wide recombination and chromosome segregation in human oocytes. *Nat Protoc.* 2016;11:1229-1243.

Peterson S. W., Knox N. C., Golding G. R., et al. A Study of the Infant Nasal Microbiome Development over the First Year of Life and in Relation to Their Primary Adult Caregivers Using cpn60 Universal Target (UT) as a Phylogenetic Marker. *PLoS One.* 2016;11:e0152493.

Thoendel M., Jeraldo P. R., Greenwood-Quaintance K. E., et al. Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing. *J Microbiol Methods.* 2016;127:141-145.

Bigdeli S., Dettloff R. O., Frank C. W., Davis R. W. and Crosby L. D. A simple method for encapsulating single cells in alginate microspheres allows for direct PCR and whole genome amplification. *PLoS One.* 2015;10:e0117738.

Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

Li N., Wang L., Wang H., et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics.* 2015;42:151-159.

Macaulay I. C., Haerty W., Kumar P., et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;.

Ottolini C. S., Newnham L. J., Capalbo A., et al. Genome-wide maps of recombination and chromosome segregation in human oocytes and embryos show selection for maternal recombination rates. *Nat Genet.* 2015;.

Zhang C. Z., Spektor A., Cornils H., et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature.* 2015;522:179-184.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

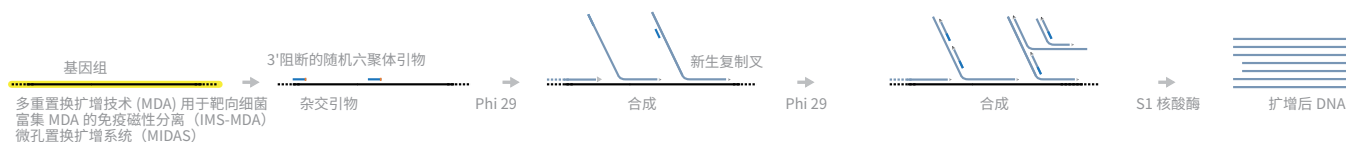
MIDAS: 微孔置换扩增系统

IMS-MDA: MDA 靶向细菌富集的免疫磁珠分离法

ddMDA: 数字微滴式 MDA

现已根据最初的 MDA 方法¹⁰⁷ 开发出了多种方法 (例如 MIDAS¹⁰⁸、ddMDA¹⁰⁹、SNES¹¹⁰ 和 IMS-MDA¹¹¹)，以改善扩增偏向性问题并提高通量。¹¹²

微孔和微滴置换扩增系统都是 MDA 方案的变型，将单细胞随机分配至成百上千个纳升级微孔或微滴中，并对其遗传物质进行扩增。¹¹³ 单细胞测序可简化遗传多样性以及细胞间固有的扩增偏向性问题。因此可提高异质性细胞群检测的代表性和灵敏度。另一种用于简化遗传多样性的方法 IMS-MDA，是利用免疫磁珠分离实现靶向细菌富集。¹¹⁴



MIDAS 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 该方法的适用模板可以是环状 DNA (例如质粒、细菌 DNA)• 可对大型模板进行测序• 可实现单细胞测序或对起始材料有限的样本进行测序 | <ul style="list-style-type: none">• PCR 偏向会导致高 GC 含量的模板比例偏低。 |

综述

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810.

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586.

Sun H. J., Chen J., Ni B., Yang X. and Wu Y. Z. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett.* 2015;365:1-10.

107. Dean F. B., Nelson J. R., Giesler T. L. and Lasken R. S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11:1095-1099.

108. Gole J., Gore A., Richards A., et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:1126-1132.

109. Rhee M., Light Y. K., Meagher R. J. and Singh A. K. Digital Droplet Multiple Displacement Amplification (ddMDA) for Whole Genome Sequencing of Limited DNA Samples. *PLoS One.* 2016;11:e0153699.

110. Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

111. Seth-Smith H. M., Harris S. R., Scott P., et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nat Protoc.* 2013;8:2404-2412.

112. Seth-Smith H. M., Harris S. R., Scott P., et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nat Protoc.* 2013;8:2404-2412.

113. Gole J., Gore A., Richards A., et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:1126-1132.

114. Seth-Smith H. M., Harris S. R., Scott P., et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nat Protoc.* 2013;8:2404-2412.

参考文献

Rhee M., Light Y. K., Meagher R. J. and Singh A. K. Digital Droplet Multiple Displacement Amplification (ddMDA) for Whole Genome Sequencing of Limited DNA Samples. *PLoS One*. 2016;11:e0153699.

研究人员通过进行试管 MDA (总体积 20 μL) 和 ddMDA (总体积 42 μL , 约分为 300,000 滴, 每滴 150 pL) 对大肠杆菌基因组进行了扩增, 其中模板 DNA 浓度的范围是 0.1 pg/ μL 至 100 pg/ μL 。他们对每种方法制备的质量 (1 ng) 相同的扩增子进行了测序。他们发现, 相同浓度下 ddMDA 能够比试管 MDA 更为显著地改善扩增质量。该效果在模板 DNA 浓度低的条件下最为明显。

Illumina 技术: MiSeq 系统、Nextera XT DNA Sample Prep Kit

Sidore A. M., Lan F., Lim S. W. and Abate A. R. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:e66.

作者证明了, 该方法能够以 4.7 fg 的起始 DNA 量完成对单个大肠杆菌细胞基因组的扩增和测序。他们得到的序列覆盖度与使用未扩增的材料相类似。

Illumina 技术: MiSeq 系统

Lan F., Haliburton J. R., Yuan A. and Abate A. R. Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing. *Nat Commun*. 2016;7:11784.

为证明该方法能够测大型 DNA 分子, 研究人员从大肠杆菌基因组中获取了长度达 10 kb 的合成 read。单分子微滴条形码 (SMDB) 技术能够检测 81 种单倍型的 457 个 SNP, 而传统的短 read 测序只能检测 1 个 SNP 而且无法生成单倍型。

Illumina 技术: MiSeq 系统

Nishikawa Y., Hosokawa M., Maruyama T., et al. Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. *PLoS One*. 2015;10:e0138733.

全基因组扩增 (WGA) 是单细胞测序流程的重要步骤, 而 MDA 是单细胞测序时最常用的 WGA 方法。尽管 MDA 得到了广泛应用, 但通常其基因组覆盖不均匀, 原因是存在扩增偏向性以及形成了 DNA 嵌合体。为解决上述问题, 作者开发了一种能够将上述干扰降至最低的微滴 MDA 方法。他们利用微流体将提取的 DNA 片段按 67 pL 的微滴划分开, 以此对各个片段进行 MDA 扩增。该方法通过对大肠杆菌细胞微滴 MDA 产物测序, 验证了其基因组覆盖度相较于传统 MDA 的 59% 提升至 89%。

Illumina 技术: MiSeq 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

Bigdeli S., Dettloff R. O., Frank C. W., Davis R. W. and Crosby L. D. A simple method for encapsulating single cells in alginate microspheres allows for direct PCR and whole genome amplification. *PLoS One*. 2015;10:e0117738.

Eastburn D. J., Huang Y., Pellegrino M., et al. Microfluidic droplet enrichment for targeted sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e86.

Fu Y., Li C., Lu S., et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:11923-11928.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

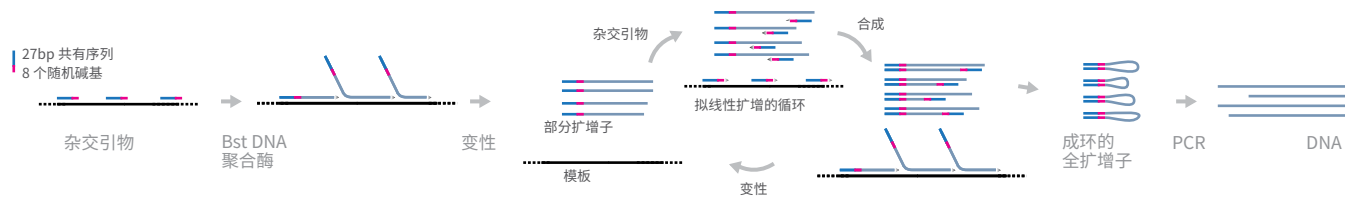
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

MALBAC：多次退火环状循环扩增技术

MALBAC 旨在克服一些 MDA 中存在的缺点¹¹⁵。

在该方法中，MALBAC 引物与 DNA 模板随机退火结合。高温下具有置换活性的聚合酶扩增模板，从而生成“半扩增子”。随着扩增和退火过程的反复进行，半扩增子逐渐扩增为 3' 端与 5' 端互补的完整扩增子。完整扩增子末端会通过杂交形成一种环状结构，从而停止扩增，而半扩增子和 gDNA 则继续扩增。对全扩增子序列进行深度测序可得到准确的 read，而测序深度越大，序列比对效果越好。该方法还可用于 cDNA 的转录组分析。¹¹⁶



MALBAC 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可对大型模板进行测序• 可实现单细胞测序或对起始材料有限的样本进行测序• 完整扩增子成环抑制了模板过度表达，从而降低了 PCR 偏向性• 可扩增 GC 含量丰富的区域• 基因组覆盖均匀• 等位基因丢失率低于 MDA | <ul style="list-style-type: none">• 聚合酶比 Phi 29 容易出错¹¹⁷• 方案对温度敏感• 基因组覆盖度最高约为 90%，¹¹⁸ 但基因组的部分区域始终处于低表达状态¹¹⁹ |

综述

Leung M. L., Wang Y., Kim C., et al. Highly multiplexed targeted DNA sequencing from single nuclei. *Nat Protoc.* 2016;11:214-235.

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Bowers R. M., Clum A., Tice H., et al. Impact of library preparation protocols and template quantity on the metagenomic reconstruction of a mock microbial community. *BMC Genomics.* 2015;16:856.

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810.

Hou Y., Wu K., Shi X., Li F., Song L., et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience.* 2015;4:37.

Li N., Wang L., Wang H., Ma M., Wang X., et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics.* 2015;42:151-159.

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586.

Snyder M. W., Adey A., Kitzman J. O. and Shendure J. Haplotype-resolved genome sequencing: experimental methods and applications. *Nat Rev Genet.* 2015;16:344-358.

Sun H. J., Chen J., Ni B., Yang X. and Wu Y. Z. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett.* 2015;365:1-10.

Wang Y. and Navin N. E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609.

115. Zong C., Lu S., Chapman A. R. and Xie X. S. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science.* 2012;338:1622-1626.

116. Briese M., Saal L., Appenzeller S., Moradi M., Baluapuri A. and Sendtner M. Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:e33.

117. Gole J., Gore A., Richards A., et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:1126-1132.

118. Lovett M. The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet.* 2013;22:R22-26.

119. Lasken R. S. Single-cell sequencing in its prime. *Nat Biotechnol.* 2013;31:211-212.

参考文献

Gui B., Yang P., Yao Z., et al. A New Next-Generation Sequencing-Based Assay for Concurrent Preimplantation Genetic Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A and Aneuploidy Screening. *J Genet Genomics*. 2016;43:155-159.

腓骨肌萎缩症 (CMT) 是最常见的遗传性神经病, 患病率为 1/2500。CMT1A 型 (CMT1A) (约占 CMT1 病例的 70%, 约占总 CMT 病例的 50%) 属于常染色体显性遗传。作者利用 MALBAC 单细胞 WGA 方法扩增单细胞 gDNA。他们证明了结合非整倍性筛查, 单次试验即可检出 CMT1A 30 重复。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Mehetre G. T., Paranjpe A. S., Dastager S. G. and Dharne M. S. Complete metagenome sequencing based bacterial diversity and functional insights from basaltic hot spring of Unkeshwar, Maharashtra, India. *Genom Data*. 2016;7:140-143.

在本研究中, 作者采用元基因组鸟枪测序法对 Unkeshwar 玄武岩温泉 (位于印度马哈拉施特拉邦的东南德干大陆地区) 的微生物群落进行了分析。他们利用 MALBAC 富集低丰度元基因组 DNA 并全面展示了该微生物组的优势种和稀有种。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Yan L., Huang L., Xu L., et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:15964-15969.

NGS 方法提升了胚胎植入前基因筛检和诊断的精确性。尽管精度始终受限于假阳性和假阴性 SNV, 但连锁分析能够解决该问题。在本研究中, 作者开发了一种将基于 HiSeq 系统的 NGS 与单细胞 WGA 相结合的方法, MARSALA。该方法允许在单分子精度下对胚胎进行诊断, 并显著降低了假阳性和假阴性误差。该方法是首个完整的基于 NGS 技术的胚胎植入前基因诊断程序, 可在检测导致疾病的突变和染色体异常的同时进行连锁分析。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Briese M., Saal L., Appenzeller S., Moradi M., Baluapuri A., et al. Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:e33.

Huang J., Yan L., Lu S., et al. Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts. *Fertil Steril*. 2016;105:1532-1536.

Chapman A. R., He Z., Lu S., et al. Single cell transcriptome amplification with MALBAC. *PLoS One*. 2015;10:e0120889.

Dey S. S., Kester L., Spanjaard B., Bienko M. and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33:285-289.

Ning L., Li Z., Wang G., Hu W., Hou Q., et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep*. 2015;5:11415.

Yan L., Huang L., Xu L., Huang J., Ma F., et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:15964-15969.

Zhang C. Z., Adalsteinsson V. A., Francis J., et al. Calibrating genomic and allelic coverage bias in single-cell sequencing. *Nat Commun*. 2015;6:6822.

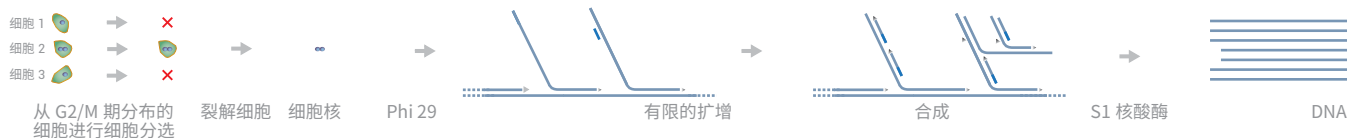
相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

nuc-seq: S 期细胞的单个 G2/M 期细胞核测序 SNES: 单细胞核外显子组测序

改进后的 MDA 方案——nuc-seq，利用了处于细胞周期 G2-M 阶段的细胞中含有 4 个基因组拷贝。该特性使得这些细胞可通过细胞分选仪分离，并且该特性可显著提高单细胞的基因组覆盖度。¹²⁰SNES 是该方法的另外一种变型，其包括针对外显子组的靶向选择和测序。¹²¹Div-Seq 方法是将 nuc-seq 与基于 5- 乙炔基 -2'- 脱氧尿苷 (EdU) 的增殖细胞脉冲标记技术相结合的一种变型。¹²²



nuc-seq 示意图。

| 方法 | 优点 | 缺点 |
|---------|---|--|
| nuc-seq | <ul style="list-style-type: none"> 可将单细胞测序的物理覆盖度提升至 90% 以上 | <ul style="list-style-type: none"> 不适用于增殖速度低的细胞 |
| SNES | <ul style="list-style-type: none"> 单细胞外显子组覆盖度达 95.94% 等基因群体中 SNV 的检出率达 92.37% | <ul style="list-style-type: none"> 仅适用于外显子组 |

综述

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586.

Zsulwach K. E., Chen P., Wang X., et al. Single-Cell Genetic Analysis Using Automated Microfluidics to Resolve Somatic Mosaicism. *PLoS One.* 2015;10:e0135007.

Voet T. and Van Loo P. SNES makes sense? Single-cell exome sequencing evolves. *Genome Biol.* 2015;16:86.

Wang Y. and Navin N. E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609.

参考文献

Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

尽管单细胞测序方法在组织异质性研究方面有着巨大潜力，但目前的单细胞 DNA-Seq 方法仍存在技术误差和测序数据物理覆盖度较差的问题。在本研究中，作者开发了一种单细胞 DNA-Seq 方法——SNES，该方法结合了 G1/0 或 G2/M 细胞核流式分选、有时间限制的 MDA、基于 TruSeq Exome Enrichment Kit 的外显子组捕获以及 HiSeq 2000 系统测序。他们通过对成纤维细胞系的单个细胞核进行分选和测序验证了 SNES。该方法的单细胞基因组覆盖度可达 96%，单细胞 SNV 的检出率为 92%，单细胞插入缺失的检出率为 85%。

illumina 技术：HiSeq 2000 系统、TruSeq Exome Enrichment Kit

120. Wang Y., Waters J., Leung M. L., et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature.* 2014;512:155-160.

121. Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

122. Habib N., Li Y., Heidenreich M., et al. Div-Seq: A single nucleus RNA-Seq method reveals dynamics of rare adult newborn neurons in the CNS. *bioRxiv.* 2016;

Leung M. L., Wang Y., Kim C., Gao R., Jiang J., et al. Highly multiplexed targeted DNA sequencing from single nuclei. *Nat Protoc.* 2016;11:214-235.

本研究介绍了一种优化的 SNES 方法，并通过添加 DNA “条形码” 在单次测序反应中同时完成对 48-96 个单个细胞的分析。相较于 SNES¹²³，该新技术的通量更高、成本更低。作者认为该技术更适用于在碱基对分辨率下检测点突变和插入缺失。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Habib N., Li Y., Heidenreich M., Swiech L., Trombetta J. J., et al. Div-Seq: A single nucleus RNA-Seq method reveals dynamics of rare adult newborn neurons in the CNS. *bioRxiv.* 2016;.

相关试剂盒

TTruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

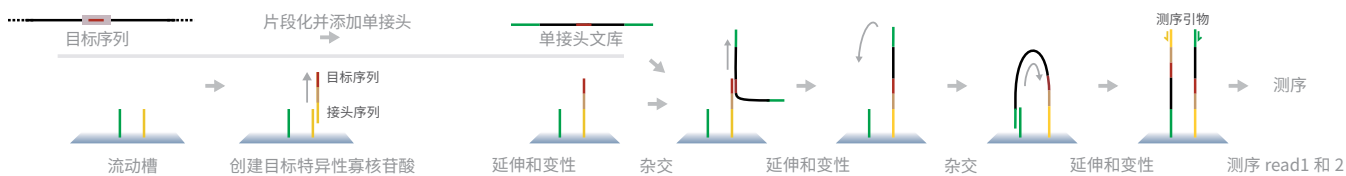
Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

123. Leung M. L., Wang Y., Waters J. and Navin N. E. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:55.

OS-Seq: 寡核苷酸选择性测序

OS-Seq¹²⁴ 用于改进靶向重测序，方法是直接在流动槽中捕获并测序目标基因。

在该方法中，用带接头的靶序列修饰流动槽引物。经修饰的引物将模板上的靶序列捕获到流动槽上。进一步延伸、变性和杂交后，得到目标基因的测序 read。深度测序给出准确的 read 结果。



OS-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可同时对多个目标基因进行重测序• 无需切胶或进行片段大小选择• 实验快速，可单日完成• 样本可进行多重检测• 由于去除了扩增步骤，因此降低了 PCR 偏向性• 可避免样本损失 | <ul style="list-style-type: none">• 引物可能会与相似的靶序列错配，导致测序结果不明确 |

综述

尚无。

参考文献

Akinrinade O., Ollila L., Vattulainen S., et al. Genetics and genotype-phenotype correlations in Finnish patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2015;36:2327-2337.

作者来自芬兰的 145 名无关联的扩张型心肌病（DCM）患者为研究对象，利用 OS-Seq 法靶定了 101 个心肌症相关基因的编码区和剪接点。当把致病性和可能致病性变异均视为致病原因时，诊断率为 35.2%（其中家族性占 47.6%，散发性占 25.6%； $P=0.004$ ）。其中，53% 的肌联蛋白（*TTN*）截断突变能够影响所有 *TTN*。

Illumina 技术：MiSeq 系统

Vattulainen S., Aho J., Salmenpera P., et al. Accurate genetic diagnosis of Finnish pulmonary arterial hypertension patients using oligonucleotide-selective sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2015;3:354-362.

DNA 样本来自 21 名芬兰的肺动脉高压（PAH）患者，并且之前已通过桑格测序法检测过 *BMPR2* 和 *ACVRL1* 的突变状态。在本研究中，作者利用 OS-Seq 筛查了包含 7 个 PAH 基因（*BMPR2*、*BMPR1B*、*ACVRL1*、*ENG*、*SMAD9*、*CAVI* 和 *KCNK3*）的 panel。该测序 panel 100% 覆盖了的靶向碱基对，测序深度 $> 15x$ 。作者鉴定出 29% 的芬兰 PAH 病例其 *BMPR2* 基因存在致病性碱基替换。其中有 2 名致病性变异阳性患者的桑格测序结果呈阴性。

Illumina 技术：MiSeq 系统

Hopmans E. S., Natsoulis G., Bell J. M., et al. A programmable method for massively parallel targeted sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:e88.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

124. Myllykangas S., Buenrostro J. D., Natsoulis G., Bell J. M. and Ji H. P. Efficient targeted resequencing of human germline and cancer genomes by oligonucleotide-selective sequencing. *Nat Biotechnol.* 2011;29:1024-1027.

Safe-SeqS: Safe 测序系统是一种用于检测稀有突变的独特分子标识符 (UMI) 方法。

Safe-SeqS (更常称之为 Safe-Seq) 是一种利用独特分子标识符 (UMI) 检测稀有突变的方法¹²⁵。自该方法于 2011 年发表之后, UMI 迅速普及 (尤其是在单细胞测序方法), 但该方法名称已弃用。

Safe-Seq 为每个模板分子分配一个 UMI, 并扩增每个带有独特标签的模板分子以构建 UMI 家族。各 UMI 的丰度可用于区分稀有突变与技术误差, 还可用于校正 PCR 扩增偏向性。



Safe-SeqS 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够区分稀有突变与技术误差• 能够从 5000 至 1,000,000 个野生型模板中检测出 1 个突变模板¹²⁶• 可校正 PCR 扩增偏向性 | <ul style="list-style-type: none">• 可能引入伪交叉杂交• 方案复杂, 需要凝胶纯化步骤¹²⁷• 要利用 2 或 4 个 PCR 循环添加条形码, 并且不能满足用一个独有条形码标记每一个分子的基本原则¹²⁸ |

综述

Gregory M. T., Bertout J. A., Ericson N. G., et al. Targeted single molecule mutation detection with massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:e22.

Wang K., Ma X., Zhang X., et al. Using ultra-sensitive next generation sequencing to dissect DNA damage-induced mutagenesis. *Sci Rep.* 2016;6:25310.

Belic J., Koch M., Ulz P., et al. Rapid Identification of Plasma DNA Samples with Increased ctDNA Levels by a Modified FAST-SeqS Approach. *Clin Chem.* 2015;61:838-849.

Do H. and Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61:64-71.

Heitzer E., Ulz P. and Geigl J. B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61:112-123.

Maslov A. Y., Quispe-Tintaya W., Gorbacheva T., White R. R. and Vijg J. High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests? *Mutat Res.* 2015;776:136-143.

Patel K. M. and Tsui D. W. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. *Clin Biochem.* 2015;48:957-961.

125. Kinde I., Wu J., Papadopoulos N., Kinzler K. W. and Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:9530-9535.

126. Kinde I., Bettgowda C., Wang Y., et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. *Sci Transl Med.* 2013;5:167ra164.

127. Stahlberg A., Krzyzanowski P. M., Jackson J. B., Egyud M., Stein L. and Godfrey T. E. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:e105.

128. Kukita Y., Matoba R., Uchida J., et al. High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA Res.* 2015;22:269-277.

参考文献

Dal Molin M., Zhang M., de Wilde R. F., et al. Very Long-term Survival Following Resection for Pancreatic Cancer Is Not Explained by Commonly Mutated Genes: Results of Whole-Exome Sequencing Analysis. *Clin Cancer Res.* 2015;21:1944-1950.

作者利用 Safe-SeqS 方法, 对 27 例通过手术切除的胰管腺肿瘤样本 (获取自长期存活者) 进行 *BRAF*、*CDKN2A*、*GNAS*、*KRAS*、*PIK3CA*、*RNF43*、*SMAD4*、*TP53* 和 *VHL* 基因测序。*KRAS* 是最常见的突变基因, 上述 27 个样本 (100%) 均发现了 *KRAS* 变化。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{IIx} 系统

Eboreime J., Choi S. K., Yoon S. R., Arnheim N. and Calabrese P. Estimating Exceptionally Rare Germline and Somatic Mutation Frequencies via Next Generation Sequencing. *PLoS One.* 2016;11:e0158340.

作者利用 Safe-SeqS 测定在人类男性生殖系统中极其稀有的新发突变发生频率。结果表明, 部分突变型的平均背景频率为 1.5×10^{-6} / 碱基, 该值远超出了已有明确记载的人类基因组各碱基对平均频率 (约 10^{-8})。这提示我们这些数据有一个非生物学解释作者认为背景频率中大部分碱基变异来自前两个 PCR 循环期间脱氨基和氧化的共同作用。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Wang Y., Springer S., Mulvey C. L., et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med.* 2015;7:293ra104.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Duplex-Seq: 双重测序

Duplex-Seq 是一种基于标签的错误校正方法，可提升测序准确性¹²⁹。

在该方法中，先将接头（带有引物序列和随机的 12 bp 标签序列）连接至模板，然后通过 PCR 扩增。深度测序可根据各独有的分子标签提供靶序列信息。通过分子标签和测序引物双重测序结果比对确定各 DNA 链上的真实序列。据估计，该方法的准确度是传统 NGS 的 10,000 倍以上。¹³⁰ 靶向版的双重测序包括 2 轮捕获，产生的 read 深度可高达 1,000,000x。¹³¹



Duplex-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 可检出万分之一的点突变¹³² 采用双重标记，因此出错率极低 可通过分析发现 PCR 扩增错误并将其消除 添加接头后无需额外的文库制备步骤 | <ul style="list-style-type: none"> 文库构建方案复杂¹³³ |

综述

Gregory M. T., Bertout J. A., Ericson N. G., Taylor S. D., Mukherjee R., et al. Targeted single molecule mutation detection with massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:e22.

Do H. and Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61:64-71.

Maslov A. Y., Quispe-Tintaya W., Gorbacheva T., White R. R. and Vijg J. High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests? *Mutat Res.* 2015;776:136-143.

129. Schmitt M. W., Kennedy S. R., Salk J. J., Fox E. J., Hiatt J. B. and Loeb L. A. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:14508-14513.

130. Ahn E. H., Hirohata K., Kohrn B. F., Fox E. J., Chang C. C. and Loeb L. A. Detection of Ultra-Rare Mitochondrial Mutations in Breast Stem Cells by Duplex Sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0136216.

131. Schmitt M. W., Fox E. J., Prindle M. J., et al. Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nat Methods.* 2015;12:423-425.

132. Schmitt M. W., Kennedy S. R., Salk J. J., Fox E. J., Hiatt J. B. and Loeb L. A. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:14508-14513, Schmitt M. W., Fox E. J., Prindle M. J., et al. Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nat Methods.* 2015;12:423-425.

133. Stahlberg A., Krzyzanowski P. M., Jackson J. B., Egyud M., Stein L. and Godfrey T. E. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:e105.

参考文献

Krimmel J. D., Schmitt M. W., Harrell M. I., et al. Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic TP53 mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:6005-6010.

作者利用 Duplex-Seq 分析了 17 份高级别浆液性卵巢癌 (HGSOC) 女病患的腹膜液样本以及 20 份未患癌女性样本中的 TP53 突变。94% (16/17) 的 HGSOC 患病女性腹膜液样本中检测出了 TP53 突变, 而正常基因组中该突变的频率低至 1/24,736。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Ahn E. H., Hirohata K., Kohn B. F., Fox E. J., Chang C. C., et al. Detection of Ultra-Rare Mitochondrial Mutations in Breast Stem Cells by Duplex Sequencing. *PLoS One*. 2015;10:e0136216.

mtDNA 易遭受活性氧自由基 (ROS) 介导的损伤, 并且比核 DNA 更容易积累突变。本研究介绍了一种利用 Duplex-Seq 对人乳腺正常上皮细胞 (非干细胞与干细胞) 中的完整 mtDNA 基因组进行超深度突变分析。结果表明干细胞内 mtDNA 基因组的随机稀有突变频率低于相应的非干细胞。作者认为原因是线粒体基因组在干细胞内比在非干细胞内的保真度更高。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Schmitt M. W., Fox E. J., Prindle M. J., Reid-Bayliss K. S., True L. D., et al. Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nat Methods*. 2015;12:423-425.

为检测稀有突变, 研究人员采用 Duplex-Seq 方案进行了 2 轮捕获, 主要是建立了一种单个基因靶向的双重测序方法。双重捕获方法的测序深度和均匀度非常好, 覆盖度可达 1,000,000x, 而平均覆盖度和最小覆盖度分别为 830,000x 和 250,000x。该方法可在 ABL1 基因靶标内的针对每个核苷酸位点得到平均超过 1000 个独特的 DNA 标签分子。

作者利用该方案对一名慢性粒细胞性白血病患者 (经靶向治疗 (伊马替尼) 后复发) 体内的 ABL1 基因进行测序。传统高通量测序未检出该个体存在任何 ABL1 突变现象。相比之下, Duplex-Seq 结果则表明存在突变率为 1% 的单点突变。该突变为 E279K, 可导致伊马替尼耐药性。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

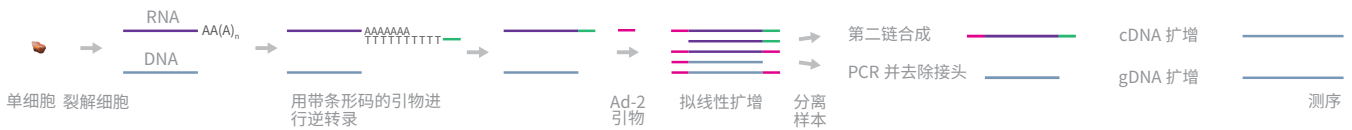
相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

DR-Seq: DNA-mRNA 测序

DR-Seq 研究的是单细胞内基因组与转录组的关系。¹³⁴ 物理分离步骤前进行核酸扩增可降低样本损失以及污染风险。DR-Seq 涉及多个扩增步骤，包括一种类似 MALBAC 的准线性扩增技术。

首先，用带有 Ad-1x 接头的 poly (dT) 引物对单细胞裂解得到的 mRNA 进行反转录，得到单链 cDNA。Ad-1x 接头序列包含能够进行细胞识别的条形码，5' Illumina 接头和 T7 启动子。接下来利用准线性 WGA 技术和 Ad-2 引物同时扩增 gDNA 和单链 cDNA。上述引物与 MALBAC 接头相似，含有 8 nt 随机序列作为随机引物，后面的 5' 端带有确定序列的 27 nt 标签。将该扩增步骤的产物分为 2 批。一半用于制备基因组测序文库，先对 gDNA 进行 PCR 扩增并使其脱离 Ad-2 接头，然后再进行 DNA 文库制备和测序。另一半用于转录组测序，合成双链 cDNA 后通过体外转录扩增 RNA。只有两端连接 Ad-1x 和 Ad-2 的 cDNA 片段能够产生 RNA，这抑制了 gDNA 片段的扩增。Illumina small-RNA 方案完成后制备 RNA 测序文库。对来自同一细胞的 gDNA 和 mRNA 进行测序可保留基因组与其表达水平间的信息。



| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可审视单细胞内的基因组和转录组行为• 分离前扩增减少了样本损失和污染• 利用基于长度的标签去除重复 read• 准线性扩增降低了 PCR 偏向性 | <ul style="list-style-type: none">• 人工单细胞分离避免了高通量造成的偏差• 准线性扩增对温度敏感• RNA read 具有 3' 端偏向性¹³⁵ |

综述

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586.

参考文献

Dey S. S., Kester L., Spanjaard B., Bienko M. and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol.* 2015;33:285-289.

在本研究中，作者介绍了最初的 DR-Seq 方法。他们先扩增了小鼠胚胎干细胞 (ESC) 的 gDNA 和 cDNA，再将核酸分开用于进一步扩增和文库构建，并通过 HiSeq 2500 系统对两文库进行测序。他们证明，细胞间转录本数量差异大的基因，其拷贝数变异发生率低，反之亦然。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

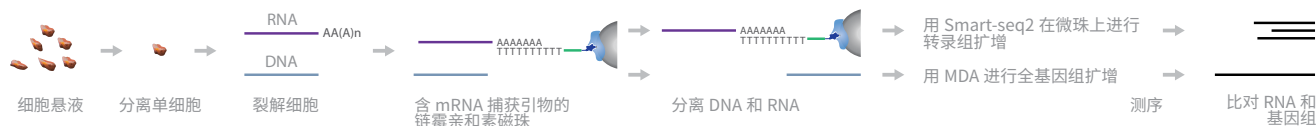
134. Dey S. S., Kester L., Spanjaard B., Bienko M. and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol.* 2015;

135. Macaulay I. C., Haerty W., Kumar P., et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;

G&T-Seq: 基因组和转录组测序

G&T-seq 可分离并测序单细胞中的 gDNA 和全长度 mRNA。¹³⁶

在该方法中，是对单细胞进行分离和裂解。先使用生物素化的寡核苷酸（dT）捕获引物捕获 RNA，然后用链霉亲和素包被磁珠将其与 DNA 分离。Smart-seq2 用于扩增微珠上捕获的 RNA，同时利用 MDA 技术扩增 DNA。测序完成后，整合 DNA 和 RNA 序列信息，以深入了解单细胞的基因表达图谱。



G&T-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">兼容所有 WGA 方法由于捕获的是全长转录本，因此序列 read 无 3'-端偏向性由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增，因此分析时无需掩盖编码序列 | <ul style="list-style-type: none">DNA 和 RNA 的物理分离会增加样本损失或污染的风险处理时间增加 |

综述

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312.

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586.

参考文献

Macaulay I. C., Haerty W., Kumar P., et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;12:519-522.

作者使用改进后的 Smart-Seq2 方案实现了 G&T-seq 的转录组分析，^{137,138} 并且在全自动液体处理工作站上实现了该方法自动化。作者对人类癌细胞、经逆转录处理得到的小鼠胚胎卵裂球以及分化自诱导多功能干细胞 (iPSC) 的神经元进行了测序。值得注意的是，非整倍体卵裂球的 G&T-seq 分析结果表明染色体获得 / 丧失会导致单细胞分裂期间染色体水平上相关基因表达的增加 / 减少。

Illumina 技术: MiSeq 系统、HiSeq 2500 系统、HiSeq X Ten 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

136. Macaulay I. C., Haerty W., Kumar P., et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;

137. Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G. and Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods.* 2013;10:1096-1098.

138. Picelli S., Faridani O. R., Bjorklund A. K., Winberg G., Sagasser S. and Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc.* 2014;9:171-181.

scM&T-Seq: 单细胞甲基化和转录组测序

scM&T-seq 能通过 Smart-seq2 和 scBS-seq 对表观遗传和基因表达谱并行分析。¹³⁹scM&T-Seq 以 G&T-seq 为基础, 但它没有采用 MDA 技术进行 DNA 测序, 而是利用 scBS-Seq 确定 DNA 的甲基化类型。

分离单细胞并独立裂解。用偶联有链霉亲和素的 mRNA 捕获引物捕获 mRNA, 使其与 DNA 链物理分离。Smart-seq2 将模板逆转录与打断贴标签法 (tagmentation) 联用, 以通过 mRNA 生成 cDNA 文库。通过 scBS-seq 制备 DNA 文库, 其中涉及用于甲基化胞嘧啶鉴定的 DNA 链亚硫酸氢盐转化。两文库均可用于测序。



scM&T-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可研究单细胞内表观遗传学异质性与转录异质性之间的关联• 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增, 因此分析时无需掩盖编码序列 | <ul style="list-style-type: none">• Smart-seq2 不具有链特异性, 因此仅适用于 poly (A) ⁺ RNA• 不能区分 5- 甲基胞嘧啶 (5mC) 与 5- 羟甲基胞嘧啶 (5hmC) |

综述

Clark S. J., Lee H. J., Smallwood S. A., Kelsey G. and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol.* 2016;17:72.

Wen L. and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol.* 2016;17:71.

参考文献

Angermueller C., Clark S. J., Lee H. J., Macaulay I. C., Teng M. J., et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2016;13:229-232.

作者利用 G&T-seq 方案纯化要进行单细胞亚硫酸氢盐测序 (scBS-seq) 的单细胞 DNA。¹⁴⁰他们对 61 个小鼠 ESC 进行了单细胞甲基化和转录组测序 (scM&T-seq)。他们发现, 许多多能性因子的基因表达水平与 DNA 甲基化呈负相关。上述数据证明, 表观遗传异质性是 ESC 多能性波动的重要机制。他们还证明了, scM&T-seq 可揭示单细胞中转录异质性与 DNA 甲基化异质性的关系。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Preparation Kit

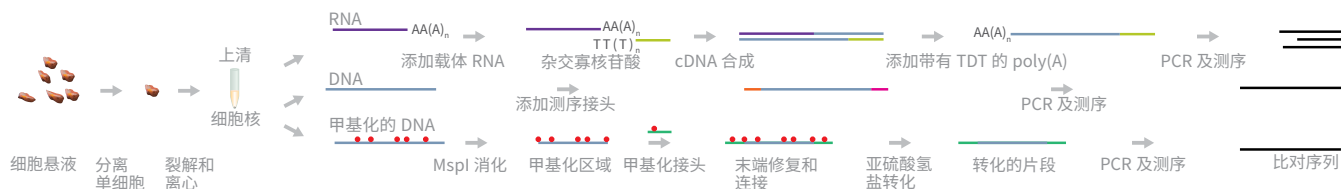
139. Angermueller C., Clark S. J., Lee H. J., et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2016;13:229-232.

140. Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2014;11:817-820.

scTrio-seq: 单细胞三重组学测序

scTrio-seq 可同时分析单个哺乳动物细胞的基因组拷贝数变异、DNA 甲基化组和转录组。¹⁴¹ 该方法是 scMT-seq 等旧方法的扩展。¹⁴²

先用一种温和的裂解缓冲液裂解单个细胞，然后将裂解产物离心。将上清液转移至新试管中用于转录组测序分析，并对细胞团块（含细胞核）进行亚硫酸氢盐转化以用于基因组和表观基因组测序。



scTrio-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 准确分析转录组、基因组和 DNA 甲基化相互调控的机制 通过单细胞简化代表性亚硫酸氢盐测序 (scRRBS) 数据得到的 CNV 数据更可靠 | <ul style="list-style-type: none"> 与 scMT-seq 相比，其转录组覆盖度较低¹⁴¹ 转录组具有 3'- 偏向性 |

综述

尚无。

参考文献

Hou Y., Guo H., Cao C., Li X., Hu B., et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319.

作者利用 scTrio-seq 分析了 25 个取自人类肝细胞癌 (HCC) 组织样本的单细胞。他们发现了 DNA 拷贝数、DNA 甲基化和 RNA 表达水平不同的 2 个亚群。通过比较 2 个 HCC 亚群间的差异，研究人员们发现含有更多拷贝获得的 CNV 的较小亚群！其表达的入侵细胞标志物数量更多，因此其避开免疫监视的可能性更大。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

141. Hou Y., Guo H., Cao C., et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319.

142. Hu Y., Huang K., An Q., et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol.* 2016;17:88.

scBS-Seq: 单细胞亚硫酸氢盐测序

scBS-seq 是成熟的亚硫酸氢盐测序 (BS-seq) 和亚硫酸氢盐处理后加接头标记 (PBAT) 方案的变型, 改进后用于检测单细胞 gDNA 中甲基化的胞嘧啶。¹⁴³

在该方法中, 单细胞分离后, 用亚硫酸氢钠处理 gDNA 使 DNA 片段化。处理后的 DNA 采用随机引物进行多次 PCR 扩增以用于测序。深度测序结果能够以单核苷酸的分辨率定位甲基化胞嘧啶。



| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">可测定单细胞中多达 48% (10.1 M) CpG 位点的 DNA 甲基化。 | <ul style="list-style-type: none">DNA 会在亚硫酸氢盐处理后降解¹⁴⁴ |

综述

Pisanic T. R., 2nd, Athamanolap P. and Wang T. H. Defining, distinguishing and detecting the contribution of heterogeneous methylation to cancer heterogeneity. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

Greenleaf W. J. Assaying the epigenome in limited numbers of cells. *Methods.* 2015;72:51-56.

Liang J., Cai W. and Sun Z. Single-cell sequencing technologies: current and future. *J Genet Genomics.* 2014;41:513-528.

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

参考文献

Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., Krueger F., Saadeh H., et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2014;11:817-820.

作者以小鼠 MII 期卵母细胞为对象测试了 scBS-seq 的性能。结果表明平均有 370 万个 CpG 二核苷酸存在甲基化, 占有所有 CpG 的 17.7%。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

143. Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2014;11:817-820.

144. Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

scAba-seq: 使用 AbaSI 核酸酶检测单细胞中的 5hmC 标记

scAba-seq 是一项具有链特异性的单细胞全基因组 5hmC 测序技术。¹⁴⁵

用 T4 噬菌体 β - 葡萄糖基转移酶 (T4- β GT) 将单个细胞 DNA 中的 5hmC 标记糖基化, 然后用限制性核酸内切酶 AbaSI 消化 DNA。将消化后的 DNA 与带有细胞特异性的条形码 (Illumina 5' 接头) 和 T7 启动子的接头连接。将来自不同细胞的 DNA (经过连接处理) 混合, 然后通过 T7 RNA 聚合酶介导的体外转录进行扩增。



scAba-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">可确定单个细胞内的链特异性 5hmC 标记 | <ul style="list-style-type: none">13% 的裂解分子使其存在不确定性¹⁴⁶AbaSI 具有序列偏向性¹⁴⁷ |

综述

尚无。

参考文献

Mooijman D., Dey S. S., Boisset J. C., Crosetto N. and van Oudenaarden A. Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2016;34:852-856.

在本研究中, 作者介绍了 scAba-seq 方法的开发过程。他们应用该方法重建 2- 细胞和 4- 细胞小鼠胚胎细胞系。对 2- 细胞胚胎的姊妹细胞中各染色体的分析表明, 姊妹细胞 1 与姊妹细胞 2 的染色体偏向性之间存在负相关。该现象在各姊妹细胞间是一致的, 即每个姊妹细胞都会接收一条 5hmC 标记含量较高的旧链和一条 5hmC 标记较低的新链。

Illumina 技术: NextSeq 500 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

145. Mooijman D., Dey S. S., Boisset J. C., Crosetto N. and van Oudenaarden A. Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2016;34:852-856.

146. Serandour A. A., Avner S., Mahe E. A., et al. Single-CpG resolution mapping of 5-hydroxymethylcytosine by chemical labeling and exonuclease digestion identifies evolutionarily unconserved CpGs as TET targets. *Genome Biol.* 2016;17:56.

单细胞 RC-Seq：单细胞反转录转座子捕获测序

单细胞 RC-seq 利用序列捕获来富集反转录转座子末端与相邻基因组区域之间的接合 DNA，然后进行双端测序。¹⁴⁸

在该方法中，先用基于荧光的流式分选（FACS）方法纯化细胞核，再用显微操作仪挑选单细胞。从细胞核中提取出 DNA 后对其进行线性 WGA，然后分 2 个独立反应使用不同的酶对得到的 DNA 进行指数 PCR 扩增。将产物混合后进行 WGS 分析以评估基因组覆盖度。先通过与锁核酸（LNA）探针杂交来富集所制备的文库，然后测序。¹⁴⁷



单细胞 RC-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">可检测单细胞内的体细胞突变 | <ul style="list-style-type: none">通量较低（由于需要人工完成单个细胞核分离） |

综述

尚无。

参考文献

Upton K. R., Gerhardt D. J., Jesuadian J. S., Richardson S. R., Sanchez-Luque F. J., et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161:228-239.

作者对单个人类海马神经元、神经胶质细胞以及皮质神经元进行了单细胞 RC-seq 测序。他们发现每个海马神经元约发生 13.7 次体细胞长散在核元件（LINE-1 或 L1）插入，并携带有靶序列引导逆转录的标志序列。海马神经元 L1 插入在转录神经干细胞增强子和海马神经元基因中更多，这表示他们可能具有功能相关性。

Illumina 技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

147. Sun Z., Dai N., Borgaro J. G., et al. A sensitive approach to map genome-wide 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine at single-base resolution. *Mol Cell*. 2015;57:750-761.

148. Upton K. R., Gerhardt D. J., Jesuadian J. S., et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161:228-239.

scATAC-Seq (细胞标签变型)：转座酶可及性染色质的单细胞检测

这一版本的 scATAC-seq 方法是利用组合式细胞标签测定每次检查中数千个单细胞中的染色质可及性。此方法无需对单个细胞进行区室化，因此该系统可同时检测分析数千个细胞。¹⁴⁹

在该方法中，先分离细胞核，在孔中用带条形码的 Tn5 转座酶对其进行批量分子标记。再将细胞核混合，取一定量重新分配至另一组孔中。在 PCR 扩增阶段引入另一个条形码，然后将片段混合用于文库制备和测序。



“scATAC-seq：组合索引版”示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">高通量、可扩展 | <ul style="list-style-type: none">未见报道 |

综述

Liu S. and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000Res*. 2016;5:

Lu F., Liu Y., Inoue A., et al. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell*. 2016;165:1375-1388.

参考文献

Corces M. R., Buenrostro J. D., Wu B., et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet*. 2016;48:1193-1203.

本研究利用改良版 scATAC-seq 方案即 Fast-ATAC，全面分析了共计 137 份样本中 13 个人类主要血细胞类型的染色质可及性和转录情况。作者发现，单个急性骨髓性白血病（AML）细胞具有独特的混合调节组谱（对应于不同的发育阶段），这可能是 HOX 因子引起的。该结果有助于深入了解造血发育及相关疾病。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统、HiSeq 2500 系统、NextSeq 500 系统

Cusanovich D. A., Daza R., Adey A., Pliner H. A., Christiansen L., et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science*. 2015;348:910-914.

研究人员将组合式细胞标签配合 scATAC-seq 共同用于单次检测数千个单细胞的染色质可及性，并给出 15,000 个以上单细胞的染色质可及性图谱。他们预测组合式细胞标签方案可以通过每次使用 384 × 384 个标签且每个孔分选 100 个细胞核的方式，灵活采集约 17,280 个细胞的数据。

Illumina 技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

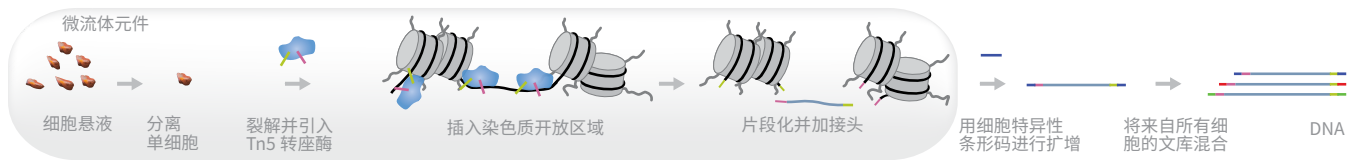
Nextera XT DNA Library Prep Kit

149. Cusanovich D. A., Daza R., Adey A., et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science*. 2015;348:910-914.

scATAC-Seq（微流体变型）：转座酶可及性染色质的单细胞检测

该版本的 scATAC-seq 方法整合在可编程的微流体平台之中。¹⁵⁰ 该方法与依靠标签进行单细胞鉴定的 scATAC-seq（组合标签版）相似。¹⁵¹

在本方案中，先用微流体设备捕获细胞，裂解，并用 Tn5 转座酶处理。再将 Tn5 片段两端延长，然后用双标签引物对上述片段进行 PCR 扩增、混合以及纯化，最后测序。



scATAC-seq 示意图：微流体版

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">可定位单个细胞中的可及性基因 | <ul style="list-style-type: none">需要专用流体设备 |

综述

Liu S. and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000Res*. 2016;5:.

Lu F., Liu Y., Inoue A., Suzuki T., Zhao K., et al. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell*. 2016;165:1375-1388.

参考文献

Buenrostro J. D., Wu B., Litzenburger U. M., Ruff D., Gonzales M. L., et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature*. 2015;523:486-490.

研究人员利用 scATAC-seq（微流体版）研究单细胞表现基因组异质性，并能够建立起顺反效应物与个体表现基因组的可及性谱变异性之间的关联。他们还鉴定出与可及性差异变大相关联的反式因子。CTCF 等其他反式因子似乎可以缓冲变异性，可能是通过为染色质可及性提供稳定锚定，或抑制潜在波动的绝缘体功能。

Illumina 技术：MiSeq 系统、HiSeq 2500 系统、NextSeq 500 系统

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

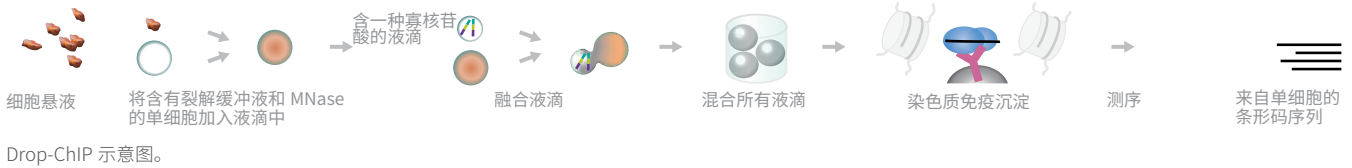
150. Buenrostro J. D., Wu B., Litzenburger U. M., et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature*. 2015;523:486-490.

151. Cusanovich D. A., Daza R., Adey A., et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science*. 2015;348:910-914.

Drop-ChIP 或 scChIP-seq：基于微滴的单细胞染色质免疫沉淀测序

Drop-ChIP 或 scChIP-seq 技术通过微流体、独特的分子标签以及 NGS 来分析单个细胞的染色质状态。¹⁵²

在该方法中，先将单细胞分离至含有裂解缓冲液和微球菌核酸酶（MNase）的微滴中，然后与携带不同寡核苷酸的微滴融合。这些寡核苷酸中包含细胞特异性标签序列、测序接头以及限制性酶切位点。此外，还通过微滴加入了 DNA 连接酶以完成标记过程。接下来，将这些染色质混合，然后进行染色质免疫沉淀反应。先按照标准的 ChIP-Seq 步骤制备文库，然后测序。



| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可高度并行分析单细胞染色质状态• 添加独特的分子条形码可降低非特异性抗体所带来的风险 | <ul style="list-style-type: none">• 每个细胞所提供的数据很少 |

综述

Clark S. J., Lee H. J., Smallwood S. A., Kelsey G. and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol.* 2016;17:72.

Wen L. and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol.* 2016;17:71.

Shin J., Ming G. L. and Song H. Decoding neural transcriptomes and epigenomes via high-throughput sequencing. *Nat Neurosci.* 2014;17:1463-1475.

参考文献

Rotem A., Ram O., Shores N., Sperling R. A., Goren A., et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;.

作者通过检测数千个单细胞证明了 scChIP-seq 方法的实用性。他们利用得到的数据将混合的 ESC、成纤维细胞和造血祖细胞拆分成各类型细胞的高质量染色质状态谱。通过检测数千个 ESC，他们能够鉴定由多能性和分化引发的染色质特征差异所定义的一系列亚群。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

152. Rotem A., Ram O., Shores N., et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;

SMDB: 单分子微滴条形码标记

SMDB 是一种利用短 read 测序获取准确长 read 的方法。¹⁵³

该方法利用微流体系统在皮升级液滴中对单个 DNA 分子进行分离、扩增、片段化以及添加分子标签。该方法通过短 read 测序多重覆盖的方式，实现了全长测序。



SMDB 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">检测极限与测序的分子数有关，并且比传统 NGS 灵敏度高几个数量级 | <ul style="list-style-type: none">需要专用设备 |

综述

尚无。

参考文献

Lan F., Haliburton J. R., Yuan A. and Abate A. R. Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing. *Nat Commun.* 2016;7:11784.

为证明 SMDB 能够准确检出稀有 SNP，作者以提取自单菌落培养物的细菌质粒为对象进行 35 个 PCR 循环以制备 DNA 模板群。此类模板群中，所有序列的同源性极高，但也存在稀有变异。与参考序列相比，作者在约 10% 的模板中鉴定出 457 个高可信度 SNP，而其余 90% 的模板不含 SNP。不使用分子标签的传统分析方法仅鉴定出 1 个 SNP。

Illumina 技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

153. Lan F., Haliburton J. R., Yuan A. and Abate A. R. Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing. *Nat Commun.* 2016;7:11784.

表观遗传学

发育、X-染色体失活、细胞分化、组织特异性基因表达、植物表观遗传变异、印记和癌症等其他疾病均涉及 DNA 甲基化和羟甲基化。¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ 甲基化通常发生在 5' 端胞嘧啶，并且在基因调控和染色质重塑过程中均有重要作用。



小鼠中活化的 *agouti* 基因可控制毛色呈黄色。向 *agouti* 基因处于活化状态的妊娠小鼠投喂富含甲基供体的饮食后，其后代的 *agouti* 基因先天处于关闭状态。该效应已用作营养和环境改变对胎儿表观基因组影响的生物传感器。¹⁵⁹

大部分胞嘧啶甲基化发生在鸟嘌呤附近的胞嘧啶处（称为 CpG 位点）。上述 CpG 位点通常位于启动子上游或基因体内。CpG 岛的定义是长度大于 500 bp、GC 含量大于 55% 并且 CpG 的预测 / 实测比值 > 0.65 的区域。

已知胞嘧啶甲基化（5mC）是抑制基因表达的沉默标记，而胞嘧啶羟甲基化（5hmC）则是促进基因表达的激活标记，并且可能是 DNA 脱甲基通路的中间体。^{14,6}5hmC 与 5mC 类似，都参与发育、细胞分化和癌症及其他疾病。¹⁶⁰

5mC 和 / 或 5hmC 可作为诊断工具协助判断营养、致癌物质¹⁶¹ 以及环境因素对疾病产生的影响。这些修饰对基因调控的影响取决于他们在基因组中的发生位置。因此，确定被修饰碱基的准确位置至关重要。

154. Smith Z. D. and Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14:204-220.

155. Jullien P. E. and Berger F. DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? *Trends Genet.* 2010;26:394-399.

156. Schmitz R. J., He Y., Valdes-Lopez O., et al. Epigenome-wide inheritance of cytosine methylation variants in a recombinant inbred population. *Genome Res.* 2013;23:1663-1674.

157. Koh K. P. and Rao A. DNA methylation and methylcytosine oxidation in cell fate decisions. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:152-161.

158. Dolinoy D. C., Weidman J. R., Waterland R. A. and Jirtle R. L. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect.* 2006;114:567-572.

159. Dolinoy D. C. The *agouti* mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev.* 2008;66 Suppl 1:S7-11, Dolinoy D. C. and Faulk C. Introduction: The use of animals models to advance epigenetic science. *ILAR J.* 2012;53:227-231.

160. Pfeifer G. P., Kadam S. and Jin S. G. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics Chromatin.* 2013;6:10.

161. Thomson J. P., Lempiainen H., Hackett J. A., et al. Non-genotoxic carcinogen exposure induces defined changes in the 5-hydroxymethylome. *Genome Biol.* 2012;13:R93.

不同亚硫酸氢盐转化方法给出的测序 read

| 碱基 | 测序 | BS 测序 | oxBS 测序 | TAB 测序 | RRBS 测序 |
|------|----|-------|---------|--------|---------|
| C | C | T | T | T | T |
| 5mC | C | C | C | T | C |
| 5hmC | C | C | T | C | C |

BS（亚硫酸氢盐测序）；oxBS（氧化亚硫酸氢盐测序）；TAB（TET 辅助亚硫酸氢盐测序）；RRBS（简化代表性亚硫酸氢盐测序）。

综述

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett.* 2016;625:47-55.

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

参考文献

Bak M., Boonen S. E., Dahl C., et al. Genome-wide DNA methylation analysis of transient neonatal diabetes type 1 patients with mutations in ZFP57. *BMC Med Genet.* 2016;17:29.

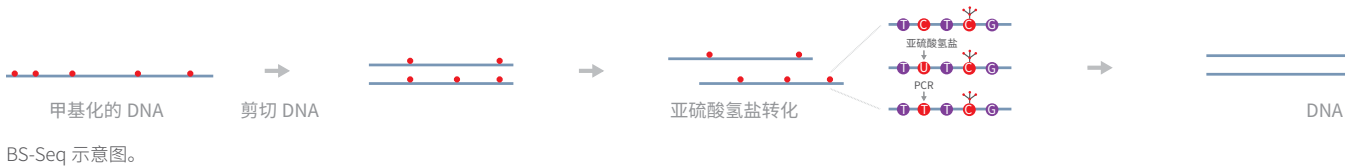
Prezza N., Vezzi F., Kaller M. and Policriti A. Fast, accurate, and lightweight analysis of BS-treated reads with ERNE 2. *BMC Bioinformatics.* 2016;17 Suppl 4:69.

BS-Seq、Bisulfite-seq 和 WGBS: 全基因组亚硫酸氢盐测序 (WGBS)

BS-Seq/Bisulfite-seq 或 WGBS 都是能够检测 gDNA 中甲基化胞嘧啶的成熟方案。¹⁶²

在该方法中, 先用亚硫酸氢钠处理 gDNA, 然后测序, 从而得到单碱基分辨率的基因组甲基化胞嘧啶图谱。完成亚硫酸氢盐处理后, 未甲基化的胞嘧啶脱氨基后变为尿嘧啶 (会在测序后转化为胸腺嘧啶)。同时, 甲基化胞嘧啶能够抵抗脱氨基作用, 因此会被识别为胞嘧啶。然后比较经处理与未经处理的序列即可确定甲基化胞嘧啶的位置。亚硫酸氢盐处理可使 DNA 中未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶, 这会使序列复杂度降低。而高精度深度测序的作用是减少上述复杂性损失。

TruSeq DNA Methylation Kit (以前称为 EpiGenome Methyl-Seq Kit) 采用独有的文库构建方法, 其中将亚硫酸氢盐转化作为第一步。



| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| BS-Seq 或 WGBS <ul style="list-style-type: none"> • 可以以单碱基分辨率覆盖全基因组范围内的 CpG 和非 -CpG 甲基化 • 覆盖密集和较不密集重复区的 5mC | <ul style="list-style-type: none"> • 亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶会降低序列复杂性, 这会增加比对难度 • 亚硫酸氢盐转化后, 胞嘧啶转换为胸腺嘧啶处的 SNP 将丢失 • 亚硫酸氢盐转化无法区分 5mC 和 5hmC |
| TruSeq DNA Methylation Kit <ul style="list-style-type: none"> • 文库制备前亚硫酸氢盐转化 • gDNA 起始用量低 (50 ng) • 可均匀覆盖 CpG、CHG 和 CHH • 无需片段化和甲基化接头 • 可保留样本多样性 | <ul style="list-style-type: none"> • 亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶会降低序列复杂性, 这会增加比对难度 • 亚硫酸氢盐转化后, 胞嘧啶转换为胸腺嘧啶处的 SNP 将丢失 • 亚硫酸氢盐转化无法区分 5mC 和 5hmC • 重复比例较高 |

综述

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett.* 2016;625:47-55.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

162. Feil R., Charlton J., Bird A. P., Walter J. and Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:695-696.

参考文献

Derks M. F., Schachtschneider K. M., Madsen O., et al. Gene and transposable element methylation in great tit (*Parus major*) brain and blood. *BMC Genomics*. 2016;17:332.

作者对大山雀 (*Parus major*) 全血和脑组织进行 WGBS 以建立基因特征、CpG 岛 (CGI)、TE 及其功能作用之间的关联。他们发现全血与脑组织之间有 6877 个 CGI (约占 21%) 存在甲基化差异, 其中有 1186 个和 2055 个分别被注释为启动子和内含子。脑部非 -CpG 甲基化的序列结构与哺乳动物中的类似, 这表明它们共同的祖先已拥有保守的非 -CpG 调控机制。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq Stranded RNA Sample Preparation Kit

Lu Y. C., Feng S. J., Zhang J. J., et al. Genome-wide identification of DNA methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to pesticide atrazine. *Sci Rep*. 2016;6:18985.

作者利用 BS-seq 确定在阿特拉津 (ATR) 中暴露的水稻其胞嘧啶甲基化模式以及基因组中 DNA 甲基化模式的变化。他们分析了在 ATR 中暴露的水稻的转录组以揭示 DNA 甲基化与基因表达之间的关联。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{IIx} 系统、HiSeq 2000 系统

Wang X., Werren J. H. and Clark A. G. Allele-Specific Transcriptome and Methylome Analysis Reveals Stable Inheritance and Cis-Regulation of DNA Methylation in *Nasonia*. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002500.

在本研究中, 作者以寄生蜂属丽蝇蝇集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 和金小蜂 (*Nasonia giraulti*) 以及其相互杂交的子一代为研究对象定量了全基因组上的等位基因特异性表达和甲基化位点。他们发现, 检测覆盖的 8000 余个基因的等位基因均不存在亲缘效应, 这表明金小蜂成虫缺少基因组印记。全部 178 个有差异的甲基化基因在 F1 杂交后代的 2 个等位基因上仍然保持差异甲基化, 这表明亲本的甲基化状态的保真度几乎达到了 100%。作者认为导致该效应的原因是存在强大的顺式作用元件促使基因体上目标基因的甲基化。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2

Zhang Y., Zhang D., Li Q., et al. Nucleation of DNA repair factors by FOXA1 links DNA demethylation to transcriptional pioneering. *Nat Genet*. 2016;48:1003-1013.

研究人员对人乳腺癌 MCF-7 细胞进行 2 次重复 WGBS 并得到单碱基分辨率的甲基化组, 共分析了 8.86 亿个 read (100 bp 双端 read)。全基因组 DNA 甲基化结果证实了 FOXA1 DNA 修复复合物的功能与 DNA 脱甲基化有关并具有细胞系特异性。下调 FOXA1 的表达量会导致大部分 FOXA1- 结合区域重新出现局部甲基化。

Illumina 技术: HiSeq 2500/4000 系统

Bogdanovic O., Smits A. H., de la Calle Mustienes E., et al. Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet*. 2016;48:417-426.

Groth M., Moissiard G., Wirtz M., et al. MTHFD1 controls DNA methylation in Arabidopsis. *Nat Commun*. 2016;7:11640.

Jeong Y. H., Lu H., Park C. H., et al. Stochastic anomaly of methylome but persistent SRY hypermethylation in disorder of sex development in canine somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep*. 2016;6:31088.

Kaajik L. J., Mokry M., Zhou M., et al. Enhancers reside in a unique epigenetic environment during early zebrafish development. *Genome Biol*. 2016;17:146.

Qu W., Tsukahara T., Nakamura R., et al. Assessing Cell-to-Cell DNA Methylation Variability on Individual Long Reads. *Sci Rep*. 2016;6:21317.

Rehan S. M., Glastad K. M., Lawson S. P. and Hunt B. G. The Genome and Methylome of a Subsocial Small Carpenter Bee, *Ceratina calcarata*. *Genome Biol Evol*. 2016;8:1401-1410.

Thienpont B., Steinbacher J., Zhao H., et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*. 2016;537:63-68.

Wallner S., Schroder C., Leitao E., et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:33.

Yang Y., Zhou R., Mu Y., et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in obese, lean, and miniature pig breeds. *Sci Rep*. 2016;6:30160.

Zhang X., Su J., Jeong M., et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat Genet*. 2016;48:1014-1023.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

PBAT：亚硫酸氢盐处理后加接头标记

PBAT 方法是在加接头前进行亚硫酸氢盐处理，以避免亚硫酸氢盐诱导带有接头标记的模板 DNA 发生片段化。¹⁶³

在亚硫酸氢盐处理完成后进行接头标记和 2 轮随机引物延伸。该过程可通过亚纳克量 DNA 得到大量未扩增 read。¹⁶⁴



PBAT 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 仅需 100 ng DNA 即可实现哺乳动物基因组的免扩增 WGBS | <ul style="list-style-type: none">• 亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为胸苷会降低序列复杂性，这会增加比对难度• 亚硫酸氢盐转化后，胞嘧啶转换为胸苷处的 SNP 将丢失• 亚硫酸氢盐转化无法区分 5mC 和 5hmC |

综述

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:26.

参考文献

Guo F., Yan L., Guo H., et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*. 2015;161:1437-1452.

人原始生殖细胞（PGC）具有独特的转录模式，其中涉及多能性基因和生殖细胞系特异性基因的同时表达，其中一部分会在不同发育阶段表现出不同特性。作者利用 PBAT 分析人 PGC 的 DNA 甲基化组。在妊娠发生后大约 10–11 周时，PGC 中几乎不存在任何 DNA 甲基化现象，男性和女性 PGC 中位甲基化程度仅为 7.8% 和 6.0%。该研究为揭示复杂的生殖系表观遗传重编程问题奠定了基础，并且其最终目标是恢复受精卵母细胞的全能性。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

Sakashita A., Kawabata Y., Jincho Y., et al. Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. *PLoS One*. 2015;10:e0144836.

作者利用 PBAT 确定去甲基化在小鼠 PGC 发育过程中所产生的影响。他们发现，除反转录转座子区以外，胎龄 13.5 天的 PGC 均处于低甲基化状态。

Illumina 技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

163. Miura F., Enomoto Y., Dairiki R. and Ito T. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:e136.

164. Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820.

BSPP：基于锁式探针的亚硫酸氢盐测序

BSPP 是一种能够分离出选定位置进行甲基化分析的靶向方法。^{165,166}

锁式探针是长度约 100 nt，与基因组上的目标 DNA 呈马蹄形进行杂交的 DNA 片段。当锁式探针的 2 个特异性杂交位点臂延伸并连接后，得到的环状 DNA 链可进行扩增和测序。¹⁶⁵



BSPP 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 仅需 100 ngDNA 即可实现哺乳动物基因组的免扩增 WGBS | <ul style="list-style-type: none">• 无法捕获 CpG 密度较低的区域¹⁶⁷ |

综述

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

尚无。

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

165. Deng J., Shoemaker R., Xie B., et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol.* 2009;27:353-360.

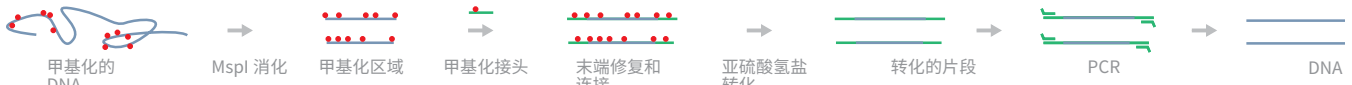
166. Ball M. P., Li J. B., Gao Y., et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol.* 2009;27:361-368.

167. Tanaka T., Reilly B., Diep D., Zhang K. and Bejar R. Cytosine Methylation Patterns As Biomarkers in MDS. *Blood.* 2015;126:5226-5226.

RRBS-Seq: 简化代表性亚硫酸氢盐测序

RRBS 利用一种或多种限制酶处理基因组 DNA 以进行序列特异性片段化。¹⁶⁸

再用亚硫酸氢盐处理片段化的基因组 DNA，然后测序。这是研究特定目标区域的首选方法。该方法对启动子区和重复序列区等甲基化水平较高的位置尤其有效。



RRBS 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够以单碱基分辨率覆盖全基因组范围内的 CpG 岛• 可覆盖密集区 CpG 甲基化 | <ul style="list-style-type: none">• 限制酶在特异性位点切割，因此序列选择具有偏向性• 该方法只能测定基因组内 10-15% 的 CpG• 无法区分 5mC 与 5hmC• 不覆盖非 CpG 区域、全基因组范围内的 CpG 以及不含限制性酶切位点区域内的 CpG。 |

综述

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett.* 2016;625:47-55.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

参考文献

Auclair G., Borgel J., Sanz L. A., et al. EHMT2 directs DNA methylation for efficient gene silencing in mouse embryos. *Genome Res.* 2016;26:192-202.

作者将 RRBS 用于基因敲除小鼠模型，以研究小鼠胚胎形成阶段赖氨酸甲基转移酶 EHMT2 在 DNA 甲基化方面所发挥的作用。结果表明，DNA 甲基化对胚胎形成阶段 EHMT2 介导的基因沉默是有帮助的。这一结果意味着，EHMT2 是哺乳动物发育过程中帮助抑制特定基因位点甲基化的关键因子。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

Day S. E., Coletta R. L., Kim J. Y., et al. Next-generation sequencing methylation profiling of subjects with obesity identifies novel gene changes. *Clin Epigenetics.* 2016;8:77.

作者结合肥胖相关转录组变化研究了骨骼肌 DNA 甲基化的作用。他们对较瘦的研究对象 ($n = 12$; 身体质量指数 (BMI) = 23.4 ± 0.7 kg/m²) 以及肥胖研究对象 ($n = 10$; BMI = 32.9 ± 0.7 kg/m²) 的骨骼肌进行基础活检。通过对胖/瘦研究对象的分析，他们发现启动子和 5'-及 3'-端非翻译区 (UTR) 存在 13,130 个差异甲基化胞嘧啶 (DMC) (未校正 $P < 0.05$)。他们还发现基因表达与 DNA 甲基化之间存在负相关。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Heller G., Topakian T., Altenberger C., et al. Next-generation sequencing identifies major DNA methylation changes during progression of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016;30:1861-1868.

作者利用 RRBS 和 RNA-Seq 分析处于慢性期 (CP)、加速期 (AP) 和急变期 (BC) 的慢性骨髓白血病 (CML) 患者样本中 CpG 位点甲基化和表达方面的差异。他们证实，从 CP-CML 发展到 AP-CML/BC-CML 的过程中 CpG 位点甲基化程度大幅增加，并鉴定出 BC-CML 样本中转录受甲基化作用调控的基因。而且其中一些基因还与多种恶性肿瘤的发病机理有关。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

168. Meissner A., Gnirke A., Bell G. W., Ramsahoye B., Lander E. S. and Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:5868-5877.

Baheti S., Kanwar R., Goelzenleuchter M., et al. Targeted alignment and end repair elimination increase alignment and methylation measure accuracy for reduced representation bisulfite sequencing data. *BMC Genomics*. 2016;17:149.

Flinders C., Lam L., Rubbi L., et al. Epigenetic changes mediated by polycomb repressive complex 2 and E2a are associated with drug resistance in a mouse model of lymphoma. *Genome Med*. 2016;8:54.

Orlanski S., Labi V., Reizel Y., et al. Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:5018-5023.

Page A., Paoli P., Moran Salvador E., et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. *J Hepatol*. 2016;64:661-673.

Pegoraro M., Bafna A., Davies N. J., Shuker D. M. and Tauber E. DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia*. *Genome Res*. 2016;26:203-210.

Yuan X. L., Gao N., Xing Y., et al. Profiling the genome-wide DNA methylation pattern of porcine ovaries using reduced representation bisulfite sequencing. *Sci Rep*. 2016;6:22138.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

BSAS：亚硫酸氢盐扩增子测序

BSAS¹⁶⁹ 是一种靶向 BS-Seq 方法，其利用 PCR 富集的目标区域和转座体介导的文库构建实现测序文库的快速生成，并且样本起始用量低（1 ng）。

基因组 DNA 经亚硫酸氢盐转化后进行 PCR（使用亚硫酸氢盐转化 DNA 专用引物）。对扩增子进行 Nextera XT 文库制备（含双标签序列）。最终文库由随机插入的经亚硫酸氢盐转化后扩增的 DNA、捕获探针以及专用标签序列组成。对上述文库进行多重分析和测序。



| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可应用于包括组织和培养细胞在内的任何 DNA 来源的任何基因组区域• 分析速度快，定量高效 | <ul style="list-style-type: none">• 不覆盖整个基因组• 基因组和目标基因必须已知 |

综述

尚无。

参考文献

Sun L., Wang J., Yin X., et al. Identification of a 5-Methylcytosine Site that may Regulate C/EBPbeta Binding and Determine Tissue-Specific Expression of the BPI Gene in Piglets. *Sci Rep.* 2016;6:28506.

杀菌 / 通透性增加蛋白（BPI）在哺乳动物的先天免疫防御功能中发挥着重要作用。作者利用 BSAS 针对断奶大白仔猪的 11 种不同组织定量了其 BPI 基因启动子中的 CpG 岛。他们确证了 mC-15 的甲基化会抑制 C/EBPb 与 BPI 启动子结合的能力，并能够影响基因表达。他们认为，这一机制对断奶仔猪 BPI 基因表达的组织特异性起作用。

Illumina 技术：MiSeq 系统

Ou X., Thakali K. M., Shankar K., Andres A. and Badger T. M. Maternal adiposity negatively influences infant brain white matter development. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23:1047-1054.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

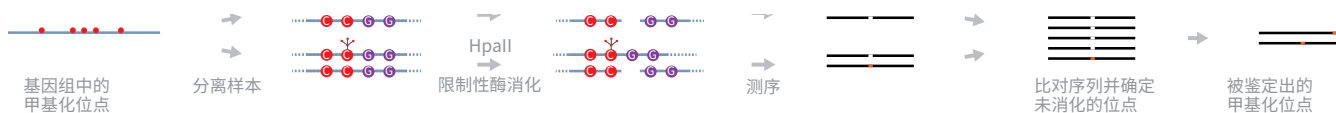
Infinium HumanMethylation450 Arrays

169. Masser D. R., Berg A. S. and Freeman W. M. Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing. *Epigenetics Chromatin.* 2013;6:33.

MRE-Seq 和 Methyl-Seq: 甲基化敏感性限制酶测序

MSRE/MRE-seq 和 Methyl-seq 方案是将甲基化敏感性限制酶 (MSRE) 应用于基因组 DNA 以研究 DNA 甲基化。^{170,171} MRE-seq 富集的是未甲基化的 DNA 并且能够覆盖人类基因组上的 170 万个 CpG 位点。¹⁷²

在该方法中, 先用不同的 MSRE 消化 gDNA。再用经过片段大小选择后的酶切片段制备文库, 然后测序。深度测序可准确检出基因组中的甲基化位点。



MSRE 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">可估计 DNA 甲基化的相对水平 | <ul style="list-style-type: none">基因组覆盖度相对较低, 原因是含 CpG 的识别位点有限 |

综述

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

Lee H. J., Lowdon R. F., Maricque B., et al. Developmental enhancers revealed by extensive DNA methylome maps of zebrafish early embryos. *Nat Commun.* 2015;6:6315.

为了解斑马鱼胚胎形成阶段 DNA 甲基化的变化情况, 研究人员针对 6 个发育阶段绘制了高分辨率的 DNA 甲基化组图谱。他们使用甲基化 DNA 免疫沉淀测序 (MeDIP-seq) 和 MRE-seq 方法为每个发育阶段构建了 2 个测序文库。总体而言, 各发育阶段基因的平均 DNA 甲基化水平几乎相同。作者发现, 甲基化水平与 TSS 的临近程度呈负相关。DNA 甲基化水平在 3'-UTR 处升高, 而在外显子处始终较高, 这类似于人类 ESC 基因区的 DNA 甲基化模式。

illumina 技术: HiSeq 系统

Chen K., Chen Z., Wu D., et al. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nat Genet.* 2015;.

Elliott G., Hong C., Xing X., et al. Intermediate DNA methylation is a conserved signature of genome regulation. *Nat Commun.* 2015;6:6363.

Gascard P., Bilenky M., Sigaroudinia M., et al. Epigenetic and transcriptional determinants of the human breast. *Nat Commun.* 2015;6:6351.

Lee H. J., Lowdon R. F., Maricque B., Zhang B., Stevens M., et al. Developmental enhancers revealed by extensive DNA methylome maps of zebrafish early embryos. *Nat Commun.* 2015;6:6315.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit

170. Maunakea A. K., Nagarajan R. P., Bilenky M., et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature.* 2010;466:253-257.

171. Brunner A. L., Johnson D. S., Kim S. W., et al. Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Res.* 2009;19:1044-1056.

172. Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

EpiRADseq: 基于甲基化敏感性限制酶的双重消化限制性位点相关 DNA 标记生成

EpiRADseq 与广泛使用的双重消化 RAD-seq 方法 (ddRADseq) 类似, 不同之处在于 EpiRADseq 使用的是 MSRE。¹⁷³

先用 PstI 和 HpaII 消化 DNA 样本, 然后纯化。在各样本上连接带有独特的标签序列的双链测序接头。然后用带有标签的引物扩增经过片段大小选择的文库。



EpiRADseq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需参考基因组 | <ul style="list-style-type: none">• 测定的是甲基化位点的子集 |

综述

尚无。

参考文献

Schild D. R., Walsh M. R., Card D. C., Andrew A. L., Adams R. H., et al. EpiRADseq: scalable analysis of genomewide patterns of methylation using next-generation sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*. 2016;7:60-69.

研究人员测试了 EpiRADseq 方法的实用性, 方法是鉴定无性繁殖水蚤 (*Daphnia ambigua*) 在接触到鱼类捕食者信号后作为响应出现的表观基因组变化。已知上述信号会诱导生活史特征出现跨代变化。在对捕食者信号的响应方面, 作者发现试验组受试基因位点的甲基化状态发生了显著的跨代变化。

Illumina 技术: MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

173. Schild D. R., Walsh M. R., Card D. C., et al. EpiRADseq: scalable analysis of genomewide patterns of methylation using next-generation sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*. 2016;7:60-69.

T-WGBS: 基于标签片段化的全基因组亚硫酸氢盐测序

T-WGBS 利用 Tn5 转座体和亚硫酸氢盐转化研究 5mC。¹⁷⁴

在该方法中,先用含甲基化引物的 Tn5 转座体(可使 DNA 片段化并连接接头)孵育 DNA。先对标记好的 DNA 进行寡核苷酸置换,然后进行甲基化寡核苷酸替换和缺口修复,确保加标签的片段化 DNA 中加入有甲基化接头。然后,用亚硫酸氢钠处理 DNA 并进行 PCR 扩增,最后测序。深度测序能够提供单碱基分辨率水平的基因组 5mC 分析结果。



T-WGBS 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">可在起始材料有限的条件下(约 20 ng) 测序实验方案速度快, 步骤少省去多个步骤, 可最大限度减少 DNA 损失 | <ul style="list-style-type: none">亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶会降低序列复杂性, 这会增加比对难度亚硫酸氢盐转化后, 胞嘧啶转换为胸腺嘧啶处的 SNP 将丢失亚硫酸氢盐转化无法区分 5mC 和 5hmC |

综述

Tang J., Fang F., Miller D. F., et al. Global DNA methylation profiling technologies and the ovarian cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:653-675.

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

Weichenhan D. and Plass C. The evolving epigenome. *Hum Mol Genet.* 2013;22:R1-6.

参考文献

Wang Q., Gu L., Adey A., Radlwimmer B., Wang W., et al. Tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing. *Nat Protoc.* 2013;8:2022-2032.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

174. Wang Q., Gu L., Adey A., et al. Tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing. *Nat Protoc.* 2013;8:2022-2032.

JBP1-seq: J 结合蛋白 1 测序

JBP1-seq 是一种可在基因组范围内分析 5hmC 的方法。它依靠的是 J 结合蛋白 1 (JBP1) 对糖化 5hmC 的强亲和性。该方法利用重组的 JBP1 蛋白以及 His 标签和 Avi 标签 (经过生物素化, 并且后续将连接至链霉亲和素包被的磁珠)。¹⁷⁵

JBP1-seq 工作流程包括 4 个主要步骤: (1) 将 gDNA 片段化并添加接头序列, (2) 用 T4-bGT 将 5hmC 位点糖基化, (3) 用 JBP1-磁珠富集含 b-glu-5hmC 的 DNA 片段, 最后 (4) 扩增富集后的文库以添加测序所需的 P5 和 P7 接头和标签序列。



JBP1-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">方案精简 | <ul style="list-style-type: none">5hmC 含量高的区域存在测序数据比例过高的问题最佳分辨率约为 50 bp |

综述

Shull A. Y., Noonpalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

参考文献

Cui L., Chung T. H., Tan D., Sun X. and Jia X. Y. JBP1-seq: a fast and efficient method for genome-wide profiling of 5hmC. *Genomics.* 2014;104:368-375.

该文献对 JBP1-seq 进行了详细介绍。

Illumina 技术: HiSeq 系统、Nextera DNA Sample Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

175. Cui L., Chung T. H., Tan D., Sun X. and Jia X. Y. JBP1-seq: a fast and efficient method for genome-wide profiling of 5hmC. *Genomics.* 2014;104:368-375.

Aba-seq: AbaSI 联用测序

Aba-seq 是一种高分辨率的 5hmC 甲基化组分析方法，可灵敏检出低占用区的 5hmC。¹⁷⁶

该方法依靠限制酶 AbaSI 独有的特性实现糖基化 5hmC 相对于 5mC 和 C 的高度特异性识别。另外还提供一种单细胞测序方法变型，scAba-seq。¹⁷⁷ 这是一种利用 PvuRts1I 解决 AbaSI 中序列偏向性问题的相关方法。¹⁷⁸



Aba-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">可覆盖全基因组范围内的 CpG 和非 -CpG 甲基化位点，并达到单碱基分辨率覆盖密集和较不密集重复区的 5mC可明确区分 5mC 与 5hmC | <ul style="list-style-type: none">13% 的裂解分子使 Aba-seq 检测存在不确定性¹⁷⁹AbaSI 活性具有序列偏向性¹⁸⁰ |

综述

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

参考文献

Sun Z., Terragni J., Borgaro J. G., Liu Y., Yu L., et al. High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep.* 2013;3:567-576.

作者利用 Aba-seq 生成高分辨率的小鼠 E14 ESC 羟甲基化组图谱。结果表明，5hmC 集中在组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸单甲基化 (H3K4me1) 的静态增强子处，而不是富集于组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化 (H3K27Ac) 的活性增强子处。作者还发现，线粒体基因组中包含非 -CG 羟甲基化位点。

Illumina 技术: HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

176. Sun Z., Terragni J., Borgaro J. G., et al. High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep.* 2013;3:567-576.

177. Mooijman D., Dey S. S., Boisset J. C., Crosetto N. and van Oudenaarden A. Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2016;34:852-856.

178. Sun Z., Dai N., Borgaro J. G., et al. A sensitive approach to map genome-wide 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine at single-base resolution. *Mol Cell.* 2015;57:750-761.

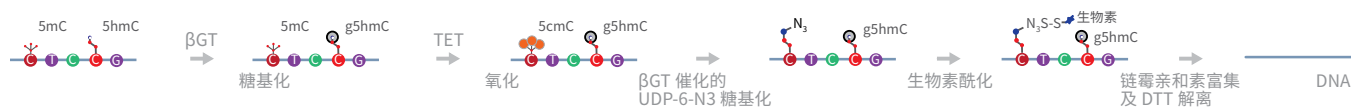
179. Serandour A. A., Avner S., Mahe E. A., et al. Single-CpG resolution mapping of 5-hydroxymethylcytosine by chemical labeling and exonuclease digestion identifies evolutionarily unconserved CpGs as TET targets. *Genome Biol.* 2016;17:56.

180. Sun Z., Dai N., Borgaro J. G., et al. A sensitive approach to map genome-wide 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine at single-base resolution. *Mol Cell.* 2015;57:750-761.

TAmC-Seq: Tet 辅助性 5- 甲基胞嘧啶测序

TAmC-Seq 利用叠氮化物残基选择性标记 5mC，叠氮化物残基可进一步标记生物素以进行亲和纯化。¹⁸¹ 该方法利用了 10-11 易位 (Tet) 酶家族中的铁离子 (II 价) / α - 酮戊二酸依赖型双加氧酶的性能 (参与 5mC 脱甲基作用)。

在该方法中，先使用常规的葡萄糖通过葡糖基化将基因组 DNA 中的内源 5hmC 保护起来。而 5mC 残基会被 mTet1- 催化的氧化作用转化为 5hmC。然后通过 b-GT- 介导的葡糖基化标记 5hmC，其过程是使用基团经过修饰的葡萄糖 (6-N₃- 葡萄糖) 生成 6-N₃-b- 葡糖基 -5- 羟甲基胞嘧啶 (N₃-5gmC)。然后利用点击化学进一步标记分子，以进行检测、亲和纯化和测序。



TAmC-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">可捕获更多甲基化 CpG，并且密度偏差更小 | <ul style="list-style-type: none">学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无。

参考文献

Zhang L., Szulwach K. E., Hon G. C., Song C. X., Park B., et al. Tet-mediated covalent labelling of 5-methylcytosine for its genome-wide detection and sequencing. *Nat Commun.* 2013;4:1517.

作者利用 TAmC-Seq 方法筛查不同小鼠和人类细胞系中的 5mC。结果表明，TAmC-Seq 方法对含有 CpG 的基因组区域覆盖度更大。此外，该方法比其他亲和富集方法捕获的甲基化 CpG 量更大，而且密度偏差更小。

Illumina 技术: HiSeq 系统、cBot 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

181. Zhang L., Szulwach K. E., Hon G. C., et al. Tet-mediated covalent labelling of 5-methylcytosine for its genome-wide detection and sequencing. *Nat Commun.* 2013;4:1517.

fC-Seal: 5- 甲酰胞嘧啶选择性化学标记

在去甲基通路中，TET 蛋白家族会将 5mC 逐步氧化为 5hmC、5- 甲酰胞嘧啶 (5fC) 和 5- 羧基胞嘧啶 (5caC)。相反，在体内，5fC 残基会通过碱基切除修复方式转化为胞嘧啶。

在 fC-Seal 方法中，基因组中的 5hmC 残基会被 β GT 用普通的葡萄糖阻断，而 5fC 残基则会被 NaBH_4 还原为 5hmC。对新生成的 5hmC 残基进行修饰、富集和测序。¹⁸²



fC-Seal 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需使用抗体 | <ul style="list-style-type: none">• 无法以单核苷酸分辨率确定 5fC 和 5caC 的位置及其相对丰度¹⁸³ |

综述

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

参考文献

Song C. X., Szulwach K. E., Dai Q., Fu Y., Mao S. Q., et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell.* 2013;153:678-691.

本研究通过对小鼠 ESC 进行全基因组范围的 5fC 分析发现，相对于其他基因调控元件，5fC 优先存在于静态增强子处。研究人员通过在亚硫酸氢盐介导的脱氨基过程中采用羟胺保护实现了 5fC 的单碱基分辨率分析，从而确证了 5fC 位点的累积。

Illumina 技术：HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

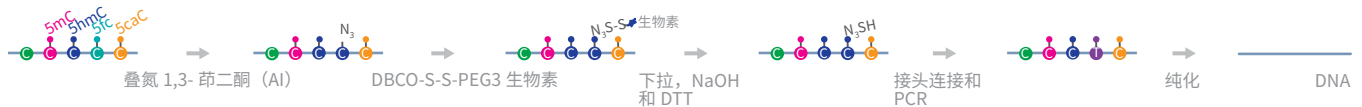
182. Song C. X., Szulwach K. E., Dai Q., et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell.* 2013;153:678-691.

183. Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

fC-CET: 5fC 化学标记和 PCR 过程中的 C 到 T 转换

fC-CET 是一种无需借助亚硫酸氢盐的全基因组 5fC 分析方法。该方法基于对 5fC 的选择性化学标记以及后续 PCR 期间的 C- 到 -T 转换。¹⁸⁴

在该方法中,先用 1,3- 茛二酮 (AI) 的叠氮衍生物标记 gDNA, 然后通过点击化学法和生物素结合。通过链霉亲和素分离法富集 gDNA 后,先为其连接接头, 然后进行 PCR 和测序。专门寻找 PCR 扩增期间的 C- 到 -T 转换, 从而确定基因组上的 5fC 位点。



fC-CET 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 结果与 fC-Seal 的一致• 测序对象是富集了约 100 倍的单一 5fC• 无明显的 DNA 降解; 非常适用于分析珍贵 DNA 样本 | <ul style="list-style-type: none">• 只能相对富集 5fC 标记的胞嘧啶¹⁸⁵ |

综述

尚无。

参考文献

Xia B., Han D., Lu X., Sun Z., Zhou A., et al. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale. *Nat Methods*. 2015;12:1047-1050.

研究人员利用 fC-CET 绘制了野生型小鼠 ESC 全基因组上 5fC 位点的碱基级分辨率图谱。在两次重复均要求存在阳性命中的情况下,他们分别在 Tdgl/fl 和 Tdg - / - 小鼠 ESC 基因组中鉴定出 32,685 个和 139,027 个高可信度 5fC 位点。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

184. Xia B., Han D., Lu X., et al. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale. *Nat Methods*. 2015;12:1047-1050.

185. Wu H., Wu X. and Zhang Y. Base-resolution profiling of active DNA demethylation using MAB-seq and caMAB-seq. *Nat Protoc*. 2016;11:1081-1100.

CAB-Seq: 化学修饰辅助性亚硫酸氢盐测序

CAB-Seq 能够以单碱基分辨率测定 DNA 中的 5caC。¹⁸⁶ 该方法利用的原理是经化学修饰的 5caC 能够在没有脱氨基作用的情况下不被亚硫酸氢盐处理。



CAB-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 单碱基分辨率 | <ul style="list-style-type: none"> 5caC 脱氨基保护率相对较低 (50–60%)¹⁸⁷ 需要对未经处理的 DNA 测序作为对照，而且经修饰胞嘧啶的检出是基于消减分析；需要较大的测序深度以降低错误率。 |

综述

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

参考文献

Lu X., Song C. X., Szulwach K., Wang Z., Weidenbacher P., et al. Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq) for 5-carboxylcytosine detection in DNA. *J Am Chem Soc.* 2013;135:9315-9317.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

186. Lu X., Song C. X., Szulwach K., et al. Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq) for 5-carboxylcytosine detection in DNA. *J Am Chem Soc.* 2013;135:9315-9317.

187. Wu H., Wu X., Shen L. and Zhang Y. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:1231-1240.

oxBS-Seq: 氧化式亚硫酸氢盐测序

oxBS-Seq 能够区分 5mC 与 5hmC¹⁸⁸。

在该方法中, 5hmC 被选择性化学试剂氧化为 5fC, 而 5mC 不发生变化。5fC 经亚硫酸氢钠处理后脱氨基变为尿嘧啶, 然后会被识别为胸腺嘧啶。对经过 oxBS 处理的 DNA 进行深度测序, 并将经处理和未经处理的 DNA 构建的文库进行序列比对, 即能够以单碱基分辨率确定 5hmC 的位置。



oxBS-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可覆盖全基因组范围内的 CpG 和非 -CpG 甲基化位点, 并达到单碱基分辨率• 覆盖密集和较不密集重复区的 5mC• 可明确区分 5mC 与 5hmC | <ul style="list-style-type: none">• 苛刻的氧化条件会导致损失大量 DNA (99.5%)• 必须配合 BS-Seq 才能够区分并定量 C、5mC 和 5hmC |

综述

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett.* 2016;625:47-55.

Marx V. Genetics: profiling DNA methylation and beyond. *Nat Methods.* 2016;13:119-122.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

Meldi K. M. and Figueroa M. E. Cytosine modifications in myeloid malignancies. *Pharmacol Ther.* 2015;152:42-53.

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

Hadad N., Masser D. R., Logan S., et al. Absence of genomic hypomethylation or regulation of cytosine-modifying enzymes with aging in male and female mice. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:30.

作者利用 oxBS-Seq 对幼年和老年雌雄小鼠海马体内基因组的 5mC 和 5hmC 进行定量。他们证明了, 随着年龄和性别不同 5mC 和 5hmC 表现出不同的水平, 具体取决于染色体、启动子和 CG 含量。

Illumina 技术: NextSeq 系统

Feng J., Shao N., Szulwach K. E., et al. Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat Neurosci.* 2015;18:536-544.

研究人员鉴定出毒瘾关键基因的推定增强子和编码区上存在 5hmC 诱导。这种 5hmC 诱导 (同样是在仅敲除 TET1 后出现) 与可卡因给药条件下毒瘾关键基因的表达量增加及选择性剪接有关。此外, 在可卡因暴露至少 1 个月后某些基因位点的 5hmC 变化仍然存在。研究人员利用 oxBS-Seq 在独立的动物组中证实了上述各基因的 5hmC 诱导。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

188. Booth M. J., Branco M. R., Ficz G., et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science.* 2012;336:934-937.

Aijo T., Huang Y., Mannerstrom H., et al. A probabilistic generative model for quantification of DNA modifications enables analysis of demethylation pathways. *Genome Biol.* 2016;17:49.

Page A., Paoli P., Moran Salvador E., White S., French J., et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. *J Hepatol.* 2016;64:661-673.

Wallner S., Schroder C., Leita E., Berulava T., Haak C., et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:33.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

redBS-Seq: 还原式亚硫酸氢盐测序

caMAB-seq: 5-羧基胞嘧啶甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序

redBS-Seq 依靠 NaBH_4 将 5fC 化学还原为 5hmC。5hmC 的检测方式与 5mC 的相同。¹⁸⁹

在 caMAB-seq 方法中, 先用 NaBH_4 将 5fC 还原为 5hmC。由于是 NaBH_4 还原与 M.SssI 处理联用, 因此 5caC 的测序是在亚硫酸氢盐转化之后以胸腺嘧啶为对象进行, 而 5mC、5hmC 和 5fC 将被识别为胞嘧啶。¹⁹⁰



redBS-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">可使 5fC 和 5caC 图谱达到碱基级分辨率 | <ul style="list-style-type: none">需要高测序深度以降低检出错率¹⁹¹ |

综述

Iatrou A., Kenis G., Rutten B. P., Lunnon K. and van den Hove D. L. Epigenetic dysregulation of brainstem nuclei in the pathogenesis of Alzheimer's disease: looking in the correct place at the right time? *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:509-523.

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

参考文献

Van Haute L., Dietmann S., Kremer L., et al. Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun.* 2016;7:12039.

作者以存在综合性线粒体呼吸链复合体缺陷的患者为对象, 利用全外显子组测序鉴定了其 5mC 甲基转移酶 (NSUN3) 基因的功能缺失突变。他们证明了, 5mC 在线粒体所编码的转移 RNA 甲硫氨酸 (mt-tRNAMet) 中的反密码子环上沉积需要 NSun3。他们还证明了, mt-tRNAMet 中的 5mC 缺陷会导致相同的 tRNA 位置缺少 5fC。作者利用 RedBS-Seq 检测野生 / 野生和突变 / 突变样本中线粒体 RNA 的 5fC。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

189. Booth M. J., Marsico G., Bachman M., Beraldi D. and Balasubramanian S. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution. *Nat Chem.* 2014;6:435-440.

190. Wu H., Wu X. and Zhang Y. Base-resolution profiling of active DNA demethylation using MAB-seq and caMAB-seq. *Nat Protoc.* 2016;11:1081-1100.

191. Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

fCAB-seq: 5- 甲酰胞嘧啶化学修饰辅助性亚硫酸氢盐测序

fCAB-Seq 是一种经 EtONH₂ 修饰的亚硫酸氢盐测序方法, 用于以碱基级分辨率检测 gDNA 中 5fC。¹⁹² 该方法是 fC-Seal (一种具有高度选择性的化学标记方法, 用于亲和纯化以及基因组范围的 5fC 分析) 的补充。¹⁹¹



fCAB-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">单碱基分辨率 | <ul style="list-style-type: none">需要相应未经处理的 DNA 测序进行对照¹⁹³ |

综述

Balasubramanian S. Chemical biology on the genome. *Bioorg Med Chem.* 2014;22:4356-4370.

Booth M. J., Marsico G., Bachman M., Beraldi D. and Balasubramanian S. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution. *Nat Chem.* 2014;6:435-440.

Rivera C. M. and Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell.* 2013;155:39-55.

参考文献

Wang L., Zhang J., Duan J., et al. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell.* 2014;157:979-991.

作者利用 fCAB-Seq 生成了 2- 细胞小鼠胚胎的碱基级分辨率 5fC 图谱。CpG 在不同基因组元件上的分布情况表明, 高度甲酰化的元件同时也是去甲基化的元件。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Van Haute L., Dietmann S., Kremer L., Hussain S., Pearce S. F., et al. Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun.* 2016;7:12039.

Xia B., Han D., Lu X., Sun Z., Zhou A., et al. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale. *Nat Methods.* 2015;12:1047-1050.

Becker D., Lutsik P., Ebert P., et al. BiQ Analyzer HiMod: an interactive software tool for high-throughput locus-specific analysis of 5-methylcytosine and its oxidized derivatives. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:W501-507.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

192. Song C. X., Szulwach K. E., Dai Q., et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell.* 2013;153:678-691.

193. Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

MAB-seq: M.SssI 甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序

MAB-seq 可同时定量绘制出单碱基分辨率的 5fC 和 5caC 图谱。¹⁹⁴ 该方法是 caMAB-seq (一种可直接绘制 5caC 图谱的方法) 的补充。¹⁹³

在该方法中, 先用能够将 CpG 二核苷酸甲基化的细菌 CpG 甲基转移酶 M.SssI 处理 gDNA。然后, 对经过甲基化酶处理过的 DNA 进行亚硫酸氢盐转化, 实现仅针对 5fC 和 5caC 的脱氨基作用; 而原本未经修饰的 CpG 被保护为 5mCpG。测序后, 5fC 和 5caC 将被识别为胸腺嘧啶, 而 5mC 会被识别为胞嘧啶。



MAB-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 可定量测定 CpG 二联体内的 5fC/5caC 丰度 | <ul style="list-style-type: none"> 无法在非 CpG 结构内区分 5fC/5caC 与未经修饰的 C |

综述

Meldi K. M. and Figueroa M. E. Cytosine modifications in myeloid malignancies. *Pharmacol Ther.* 2015;152:42-53.

参考文献

Aijo T., Huang Y., Mannerstrom H., Chavez L., Tsagaratou A., et al. A probabilistic generative model for quantification of DNA modifications enables analysis of demethylation pathways. *Genome Biol.* 2016;17:49.

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., et al. Single-Base Resolution Analysis of 5-Formyl and 5-Carboxyl Cytosine Reveals Promoter DNA Methylation Dynamics. *Cell Rep.* 2015;10:674-683.

相关试剂盒

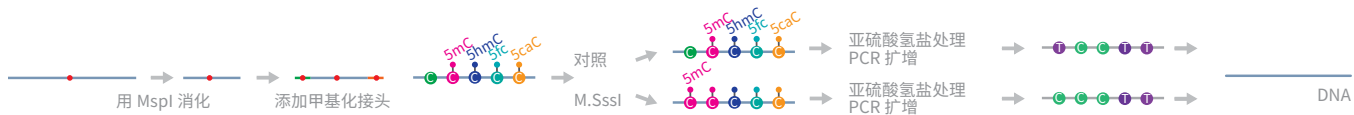
TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

194. Wu H., Wu X., Shen L. and Zhang Y. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:1231-1240.

RRMAB-seq: 简化代表性 M.SssI 甲基化酶辅助性亚硫酸氢盐测序

RRMAB-seq 是在使用 MspI 酶预处理 gDNA 的基础上进行的, 该酶可识别并切割 CCGG 序列以富集基因启动子等 CpG 丰富区域。¹⁹⁵ 该方法是 MAB-seq 的变型。¹⁹⁶



RRMAB-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">高丰度 CpG 区覆盖度的提高降低了测序成本并增加了 read 深度减少了亚硫酸氢盐处理前所需进行的化学修饰或酶催化 DNA 处理次数 | <ul style="list-style-type: none">无法在非 -CpG 结构内区分 5fC/5caC 与未经修饰的 C¹⁹⁵ |

综述

尚无。

参考文献

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Parlato C. and Oliviero S. Methylation-assisted bisulfite sequencing to simultaneously map 5fC and 5caC on a genome-wide scale for DNA demethylation analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:1191-1205.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

195. Neri F., Incarnato D., Krepelova A., et al. Single-Base Resolution Analysis of 5-Formyl and 5-Carboxyl Cytosine Reveals Promoter DNA Methylation Dynamics. *Cell Rep.* 2015;10:674-683.

196. Wu H., Wu X., Shen L. and Zhang Y. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:1231-1240.

TAB-Seq: Tet 辅助性亚硫酸氢盐测序

TAB-Seq 是一种利用亚硫酸氢盐转化和 Tet 蛋白研究 5hmC 的新方法。¹⁹⁷

在该方法中,先用葡糖基选择性保护 5hmC,然后用 Tet 蛋白将 5mC 氧化为 5caC。接下来,用亚硫酸氢盐处理氧化后的 gDNA;5hmC 始终不变并被识别为胞嘧啶,而 5mC 和未甲基化胞嘧啶将被脱氨基变成尿嘧啶并在测序时被识别为胸腺嘧啶。与未处理的 DNA 相比,TAB 处理的 DNA 深度测序提供了 5hmC 在基因组中的准确定位。



TAB-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可覆盖全基因组范围内的 CpG 和非 -CpG 羟甲基化位点,并达到单碱基分辨率• 覆盖密集和较不密集重复区的 5hmC• 可明确区分 5hmC 与 5mC,尤其适用于鉴定 5hmC | <ul style="list-style-type: none">• 苛刻的氧化条件会导致 DNA5 大量损失 |

综述

Aijo T., Huang Y., Mannerstrom H., Chavez L., Tsagaratou A., et al. A probabilistic generative model for quantification of DNA modifications enables analysis of demethylation pathways. *Genome Biol.* 2016;17:49.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

Bogdanovic O., Smits A. H., de la Calle Mustienes E., Tena J. J., Ford E., et al. Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet.* 2016;48:417-426.

作者利用 TAB-Seq 法生成了斑马鱼、非洲爪蟾和小鼠胚胎的单碱基分辨率 5hmC 图谱。斑马鱼、非洲爪蟾和小鼠的 5hmC 信号与发生在早期和后期差异甲基化区域的发育性去甲基化同时出现。

Illumina 技术: HiSeq 1500 系统

Chen K., Zhang J., Guo Z., et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. *Cell Res.* 2016;26:103-118.

作者利用 TAB-Seq 证明了,相较于对应的正常组织,肾肿瘤内不存在全局性 5mC 缺失。但他们发现,几乎所有的肾肿瘤组织都存在全局性 5hmC 缺失。恢复 5hmC 水平可削弱肿瘤细胞的浸润能力并抑制移植瘤模型中肿瘤的生长。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Greco C. M., Kunderfranco P., Rubino M., et al. DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy. *Nat Commun.* 2016;7:12418.

作者研究了胚胎、新生儿、成人以及肥大的小鼠心肌细胞的羟甲基化组。他们发现,DNA 羟甲基化在心脏发育和疾病状态下表现出高活性。TAB-Seq 分析结果表明,肥大心肌细胞中 LINE-1 羟甲基化程度很高,并伴随有 CG 去甲基化。作者认为,在肥厚型心脏中,5hmC 的作用可能是使 LINE-1 区域的染色质结构更加开放。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

197. Yu M., Hon G. C., Szulwach K. E., et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell.* 2012;149:1368-1380.

Yu P., Ji L., Lee K. J., et al. Subsets of Visceral Adipose Tissue Nuclei with Distinct Levels of 5-Hydroxymethylcytosine. *PLoS One*. 2016;11:e0154949.

作者利用 TAB-Seq 分析证明了在不同类型内脏脂肪组织 (VAT) 细胞核的基因体内, 5hmC 水平变化显著。上述水平在基因表达量最高时是最低时的 3.8 倍。其结果表明, VAT 分化脂肪细胞在重塑染色质方面的活性强于非脂肪细胞。

Illumina 技术: NextSeq 500 系统

Mooijman D., Dey S. S., Boisset J. C., Crosetto N. and van Oudenaarden A. Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol*. 2016;34:852-856.

Serandour A. A., Avner S., Mahe E. A., Madigou T., Guibert S., et al. Single-CpG resolution mapping of 5-hydroxymethylcytosine by chemical labeling and exonuclease digestion identifies evolutionarily unconserved CpGs as TET targets. *Genome Biol*. 2016;17:56.

Thienpont B., Steinbacher J., Zhao H., D'Anna F., Kuchnio A., et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*. 2016;537:63-68.

Guo F., Yan L., Guo H., Li L., Hu B., et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*. 2015;161:1437-1452.

Li Q., Suzuki M., Wendt J., et al. Post-conversion targeted capture of modified cytosines in mammalian and plant genomes. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e81.

Xia B., Han D., Lu X., Sun Z., Zhou A., et al. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale. *Nat Methods*. 2015;12:1047-1050.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

MIRA: 甲基化 CpG 岛回收分析 (MIRA)

MIRA 利用甲基化 CpG 结合蛋白复合物 (MBD2B 和 MBD3L1) 的高亲和性来富集含有甲基化 CpG 二核苷酸的区域。¹⁹⁸ 该方法对基于芯片的 DNA 分析以及 NGS 均适用, 但有时被区分为 MIRA-chip¹⁹⁹ 和 MIRA-seq。²⁰⁰

在此过程中, 将片段化的 gDNA 与纯化的 GST-MBD2B 和 His-MBD3L1 蛋白一起孵育。高亲和性 MBD2B/MBD3L1 复合物与甲基化的 gDNA 模板结合。用谷胱甘肽包被的磁珠捕获甲基化的 gDNA 片段。富集的甲基化 DNA 产物进行扩增、标记以及 NGS 分析。



MIRA 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 特异性和灵敏度高, gDNA 起始用量可低至 1 ng• 无需 DNA 变性• 不依赖限制性位点 | <ul style="list-style-type: none">• 分辨率局限于 100 个碱基• 要求所捕获的片段上至少有 2 个甲基化的 CpG²⁰¹ |

综述

尚无。

参考文献

Benjamin A. L., Green B. B., Crooker B. A., McKay S. D. and Kerr D. E. Differential responsiveness of Holstein and Angus dermal fibroblasts to LPS challenge occurs without major differences in the methylome. *BMC Genomics*. 2016;17:258.

作者以乳牛 (Holstein) 和肉牛 (Angus) 为对象进行成纤维细胞培养并用脂多糖 (LPS) 对培养物进行激发, 以测定先天性免疫反应的品种间差异。RNA-Seq 分析表明 Holstein 品种对 LPS 的反应比 Angus 品种更稳定。MIRA-seq 分析表明两个品种的全基因组 DNA 甲基化谱类似, 并且基因启动子整体处于低甲基化水平。但作者发现 Holstein 和 Angus 纤维原细胞之间, 有 49 个区域存在差异甲基化现象。

Illumina 技术: HiSeq 1000 系统、cBot 系统

Jin S. G., Xiong W., Wu X., Yang L. and Pfeifer G. P. The DNA methylation landscape of human melanoma. *Genomics*. 2015;106:322-330.

作者利用 MIRA-seq 确立了正常黑色素细胞和 27 个转移性黑色素瘤样本的 DNA 甲基化组。他们发现所有 (27/27) 黑色素瘤分析结果中均存在 179 个肿瘤特异性甲基化峰, 并认为上述峰可能是潜在的疾病标记物。

Illumina 技术: HiSeq 系统

Yoneda A., Henson W. R., Goldner N. K., et al. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:2240-2254.

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

Infinium HumanMethylation450 Arrays

198. Rauch T. A. and Pfeifer G. P. DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods*. 2010;52:213-217.

199. Jung M., Jin S. G., Zhang X., et al. Longitudinal epigenetic and gene expression profiles analyzed by three-component analysis reveal down-regulation of genes involved in protein translation in human aging. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e100.

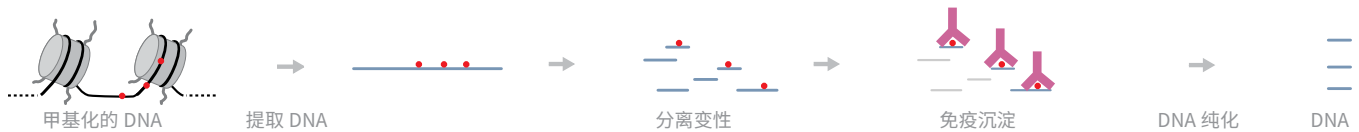
200. Benjamin A. L., Green B. B., Crooker B. A., McKay S. D. and Kerr D. E. Differential responsiveness of Holstein and Angus dermal fibroblasts to LPS challenge occurs without major differences in the methylome. *BMC Genomics*. 2016;17:258.

201. Rauch T. A. and Pfeifer G. P. Methods for Assessing Genome-wide DNA Methylation. 2011;135-147.

MeDIP-Seq: 甲基化 DNA 免疫沉淀 DIP-seq: DNA 免疫沉淀后进行高通量测序

MeDIP-seq 用于研究 5mC 修饰。²⁰² 该方法是基于 MeDIP（一种原本开发用于免疫捕获甲基化 DNA 后进行芯片分析的方法）。²⁰³ 该方法的一种变型可检测 5hmC 以提供更完整的胞嘧啶修饰信息（请参阅 hMeDIP-seq）。²⁰⁴

在该方法中，先利用抗 5mC 抗体通过免疫沉淀反应从片段化的 gDNA 中分离出甲基化 DNA。分离得到的 DNA 片段经过纯化后用于制备测序文库。深度测序可提高基因组覆盖度，从而检测出大多数免疫沉淀获得的甲基化 DNA。



MeDIP-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">可覆盖全基因组范围内的 CpG 和非-CpG 5mC 位点覆盖密集和较不密集重复区的 5mC基于抗体的选择不依赖序列，并且由于抗体具有特异性因此不会富集 5hmC在不要求单碱基分辨率时可作为一种经济高效的测序方法²⁰⁵ | <ul style="list-style-type: none">和其他方法能够达到单碱基分辨率相比，该方法的碱基分辨率较低（约 150 bp）抗体特异性和选择性必须先经过测试，以避免非特异性相互作用对超甲基化区域有偏向性²⁰⁴ |

综述

Sharma G., Sowpati D. T., Singh P., et al. Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during *M. tuberculosis* infection. *Sci Rep.* 2016;6:25006.

Soto J., Rodriguez-Antolin C., Vallespin E., de Castro Carpeno J. and Ibanez de Caceres I. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. *Transl Res.* 2016;169:1-18 e11.

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

202. Weber M., Davies J. J., Wittig D., et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005;37:853-862.

203. Weber M., Davies J. J., Wittig D., et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005;37:853-862.

204. Xu Y., Wu F., Tan L., et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell.* 2011;42:451-464.

205. Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

参考文献

Staubstrup N. H., Starnawska A., Nyegaard M., et al. Genome-wide DNA methylation profiling with MeDIP-seq using archived dried blood spots. *Clin Epigenetics*. 2016;8:81.

利用产前筛查项目常规采集的干血斑 (DBS) 进行全表观基因组关联性研究逐渐成为热点。在本研究中, 作者采用 MeDIP-seq 法对已归档长达 16 年的过滤卡上的单个 3.2 mm DBS 孔 (60 ng DNA) 进行了甲基化测序, 从而证明了该方法的可行性。作者得出的结论是, 从富集效果、序列质量以及跨基因区的 read 分布几个方面来看, 已归档 16 年、已归档 4 年和新制备对照三者的分析结果差别不大。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Tang A., Huang Y., Li Z., et al. Analysis of a four generation family reveals the widespread sequence-dependent maintenance of allelic DNA methylation in somatic and germ cells. *Sci Rep*. 2016;6:19260.

为评估人类的跨代 DNA 甲基化谱, 作者利用 MeDIP-seq 分析了家族 4 代的体细胞和生殖细胞 DNA 甲基化组。他们发现, 同一个体的体细胞和生殖细胞之间, 绝大多数经顺式调控的基因位点的等位基因甲基化谱相同。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{IIx} 系统

Han B., Li W., Chen Z., et al. Variation of DNA Methylation of Zebrafish Cells under Cold Pressure. *PLoS One*. 2016;11:e0160358.

作者通过 MeDIP-seq 发现了斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎成纤维细胞 (ZF4) 在寒冷刺激条件下全基因组甲基化图谱出现的变化。他们发现, 21% 的甲基化峰在寒冷处理后出现了明显的变化。发生变化的 DNA 甲基化峰约有 8% 位于启动子区, 而其中大多数位于非编码区。参与生命活动过程 (例如发育和免疫应答) 的多个基因的甲基化明显受到了影响, 表明这些过程会通过调控 DNA 甲基化对寒冷刺激做出响应。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Halder R., Hennion M., Vidal R. O., et al. DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat Neurosci*. 2016;19:102-110.

为了解短期和长期记忆的表现遗传过程, 作者针对 2 个不同的小鼠大脑区域、2 种细胞类型以及情境学习前后的 3 个时间点研究了染色质修饰变化。他们通过 ChIP-Seq 和 MeDIP-seq 发现, 组蛋白修饰在记忆获取阶段发生了显著变化, 并且令人感到意外的是与基因表达几乎无关。该数据为记忆获取和保持的分子构架提供了证据, 其中 DNA 甲基化可能会改变功能可塑性以及突触连接相关基因的表达和剪接。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Chowdhury B., Seetharam A., Wang Z., et al. A Study of Alterations in DNA Epigenetic Modifications (5mC and 5hmC) and Gene Expression Influenced by Simulated Microgravity in Human Lymphoblastoid Cells. *PLoS One*. 2016;11:e0147514.

Lucas E. S., Dyer N. P., Murakami K., et al. Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss. *Stem Cells*. 2016;34:346-356.

Pheiffer C., Erasmus R. T., Kengne A. P. and Matsha T. E. Differential DNA methylation of microRNAs within promoters, intergenic and intragenic regions of type 2 diabetic, pre-diabetic and non-diabetic individuals. *Clin Biochem*. 2016;49:433-438.

Su Y., Fan Z., Wu X., et al. Genome-wide DNA methylation profile of developing deciduous tooth germ in miniature pigs. *BMC Genomics*. 2016;17:134.

Sun L. X., Wang Y. Y., Zhao Y., et al. Global DNA Methylation Changes in Nile Tilapia Gonads during High Temperature-Induced Masculinization. *PLoS One*. 2016;11:e0158483.

Yang Y., Zhou R., Mu Y., Hou X., Tang Z., et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in obese, lean, and miniature pig breeds. *Sci Rep*. 2016;6:30160.

Zeng Y., Yao B., Shin J., et al. Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression. *Mol Cell*. 2016;61:153-160.

相关试剂盒

Infinium HumanMethylation450 Arrays

Nextera DNA Library Prep Kit

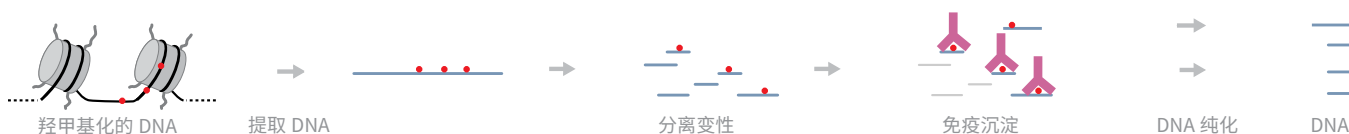
Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

hMeDIP-seq: 羟甲基化 DNA 免疫沉淀和测序

hMeDIP-Seq 用于研究 5hmC 修饰。²⁰⁶ 该方法是稍加改动的 MeDIP-seq 方法（基于 Weber 等人发表的最初的 MeDIP 方法²⁰⁷）。该方法在技术上与 MeDIP-seq 几乎完全相同却仍将其视为独立的方法，原因是该方法提供独特的生物学见解。要全面了解表观遗传变化，5mC 和 5hmC 修饰都应进行测定。²⁰⁸

通过免疫沉淀从基因组 DNA 中分离出甲基化 DNA。使用抗 5hmC 抗体与片段化的 gDNA 一起孵育并沉淀，然后进行 DNA 纯化并制备测序文库。深度测序可提高基因组覆盖度，从而检测出大多数免疫沉淀获得的羟甲基化 DNA。



hMeDIP-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">覆盖密集和较不密集重复区的 5hmC由于抗体专一性，基于抗体的选择与序列无关，不会富集 5mC。 | <ul style="list-style-type: none">与其他方法可以达到单碱基分辨率相比，该方法的碱基分辨率较低（约 150 bp）抗体特异性和选择性必须先经过测试，以避免非特异性相互作用对高甲基化区域有偏向性 |

综述

Kamdar S. N., Ho L. T., Kron K. J., Isserlin R., van der Kwast T., et al. Dynamic interplay between locus-specific DNA methylation and hydroxymethylation regulates distinct biological pathways in prostate carcinogenesis. *Clin Epigenetics*. 2016;8:32.

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett*. 2016;625:47-55.

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:627-651.

参考文献

Chowdhury B., Seetharam A., Wang Z., Liu Y., Lossie A. C., et al. A Study of Alterations in DNA Epigenetic Modifications (5mC and 5hmC) and Gene Expression Influenced by Simulated Microgravity in Human Lymphoblastoid Cells. *PLoS One*. 2016;11:e0147514.

尽管微重力具有多种生理效应，但其对表观基因组的影响尚未明确。在本研究中，作者采用 MeDIP-seq、hMeDIP-seq 和 RNA-Seq 方法测定了人类淋巴瘤细胞在模拟微重力环境下被诱发的 DNA 甲基化（5mC）、羟甲基化（5hmC）及对基因表达的影响。他们发现模拟微重力诱发了甲基化组变化：约 60% 的差异甲基化区（DMR）发生了低甲基化，同时约 92% 的差异羟甲基化区（DHMR）发生了高羟甲基化。上述诱发变化在启动子区和基因体中均存在。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

206. Xu Y., Wu F., Tan L., et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2011;42:451-464.

207. Weber M., Davies J. J., Wittig D., et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37:853-862.

208. Kamdar S. N., Ho L. T., Kron K. J., et al. Dynamic interplay between locus-specific DNA methylation and hydroxymethylation regulates distinct biological pathways in prostate carcinogenesis. *Clin Epigenetics*. 2016;8:32.

Devall M., Roubroeks J., Mill J., Weedon M. and Lunnon K. Epigenetic regulation of mitochondrial function in neurodegenerative disease: New insights from advances in genomic technologies. *Neurosci Lett*. 2016;625:47-55.

多种神经退行性疾病均涉及 mtDNA 甲基化变化。研究人员利用 MeDIP-seq、hMeDIP-seq、BS-Seq、ChIP-Seq 和 RNA-Seq 确定了成体干细胞中 Dnmt3a 和 Dnmt3b 的结构和功能。他们发现 Dnmt3a 和 Dnmt3b 在调控增强子时作用的基因不同：Dnmt3a 是联合 p63 共同在增强子中心维持高水平的 DNA 羟甲基化并且依赖 Tet2，而 Dnmt3b 是沿增强子体促 DNA 甲基化。任何一种蛋白的消耗都会导致相应目标增强子活性的降低，并会显著影响表皮干细胞的功能。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Kamdar S. N., Ho L. T., Kron K. J., Isserlin R., van der Kwast T., et al. Dynamic interplay between locus-specific DNA methylation and hydroxymethylation regulates distinct biological pathways in prostate carcinogenesis. *Clin Epigenetics*. 2016;8:32.

作者研究了前列腺癌中受表观遗传修饰调控的功能通路和基因。他们利用 hMeDIP-seq 分析癌细胞并发现存在羟甲基化分布被破坏的现象，其中羟甲基化全局缺失并且在启动子和 CpG 岛区域高度特异性增加。他们在特定内含子区和基因间区发现了羟甲基化标记的位点特异性保留。作者认为上述修饰可能在癌症关键功能通路（例如，BARD1 信号转导和甾体激素受体信号转导）的基因表达调控方面发挥着全新的作用。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统、HiSeq 2500 系统

Bogdanovic O., Smits A. H., de la Calle Mustienes E., Tena J. J., Ford E., et al. Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet*. 2016;48:417-426.

Uribe-Lewis S., Stark R., Carroll T., et al. 5-hydroxymethylcytosine marks promoters in colon that resist DNA hypermethylation in cancer. *Genome Biol*. 2015;16:69.

Zhu L., Lv R., Kong L., et al. Genome-Wide Mapping of 5mC and 5hmC Identified Differentially Modified Genomic Regions in Late-Onset Severe Preeclampsia: A Pilot Study. *PLoS One*. 2015;10:e0134119.

相关试剂盒

Infinium HumanMethylation450 Arrays

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

MBDCap-seq: 基于甲基化 CpG 结合域 (MBD) 的捕获和测序

MethylCap-Seq: 使用 MeCP2 的甲基化 CpG 结合域 MBD 来捕获甲基化 DNA

MiGS: 甲基化 CpG 结合域分离的基因组测序

MBDCap^{209,210} 和 MethylCap^{211,212} 通过亲和纯化来富集甲基化 DNA。这些方法尤其适用于研究超甲基化的区域阻滞。术语 MiGS 很容易与常用术语 MIGS (基因组序列的最小化信息) 混淆, 前者很少用到。

在这些方法中, 首先将 gDNA 超声处理, 并与可结合甲基化胞嘧啶的带标记的 MBD 蛋白一起孵育。然后, 使用针对该蛋白的抗体标记的微珠共沉淀该蛋白质-DNA 复合物。接着纯化 DNA, 并将其用于制备测序文库。深度测序提供了更大的基因组覆盖度, 可检测出大部分和 MBD 结合的甲基化 DNA。



MBDCap-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 研究超甲基化的区域阻滞 与 HM450K 芯片相比, MBDCap-seq 对岛架 (77% vs 28%)、增强子 (12% vs 2%) 和绝缘子 (11% vs 1%) 的区域覆盖度更高²¹³ 福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织的 MBDCap-Seq 提供了与新鲜冷冻样本 DNA 相当的甲基化数据²¹² MBD 蛋白可以对 5mC 和 5hmC 进行区分²¹⁴ | <ul style="list-style-type: none"> 与其他方法可以达到单碱基分辨率相比, 该方法的碱基分辨率较低 (约 150 bp) 对超甲基化区域有偏向性 |

综述

Soto J., Rodriguez-Antolin C., Vallespin E., de Castro Carpeno J. and Ibanez de Caceres I. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. *Transl Res.* 2016;169:1-18 e11.

Tang J., Fang F., Miller D. F., Pilrose J. M., Matei D., et al. Global DNA methylation profiling technologies and the ovarian cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:653-675.

Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

209. Rauch T. A., Zhong X., Wu X., et al. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:252-257.
 210. Rauch T. A. and Pfeifer G. P. The MIRA method for DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol.* 2009;507:65-75.
 211. Bock C., Tomazou E. M., Brinkman A. B., et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1106-1114.
 212. Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., Kaan A., Zhu J. and Stunnenberg H. G. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods.* 2010;52:232-236.
 213. Stirzaker C., Zotenko E., Song J. Z., et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun.* 2015;6:5899.
 214. Yong W. S., Hsu F. M. and Chen P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26.

参考文献

Boers A., Wang R., van Leeuwen R. W., et al. Discovery of new methylation markers to improve screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3. *Clin Epigenetics*. 2016;8:29.

作者使用 MethylCap-seq 鉴定用于检测高级别宫颈上皮内瘤样病变 (CIN) 的新型甲基化标记: CIN2/3 或 CIN2 及更高级别 (CIN2+)。他们发现与正常宫颈组织刮片相比, 癌组织中 8/9 基因的甲基化水平明显更高。对于因巴氏涂片异常而转诊的患者, 所有 8 个基因的甲基化水平都随着其刮片中潜在组织学病变的严重程度增加而升高。

Illumina 技术: Genome Analyzer II 系统

Stirzaker C., Zotenko E., Song J. Z., Qu W., Nair S. S., et al. Methyloome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun*. 2015;6:5899.

作者利用 MBDCap-seq 分析三阴乳腺癌 (TNBC) 的福尔马林固定石蜡包埋组织及对应正常组织的样本。他们鉴定出具有 TNBC 特异性的区域甲基化图谱, 并使用从癌症基因组图谱计划 (TCGA) 乳腺癌群样本中提取的甲基化数据进行验证。他们还报告了存活样本中首个可能的 TNBC 特异性甲基化特征, 并表明它在更大的群体中具有预后评估的价值。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{IIx} 系统

Wang Y., Jadhav R. R., Liu J., et al. Roles of Distal and Genic Methylation in the Development of Prostate Tumorigenesis Revealed by Genome-wide DNA Methylation Analysis. *Sci Rep*. 2016;6:22051.

作者利用 MBDCap-seq 对前列腺癌组织样本进行分析, 根据 Gleason 分值将样本分为低风险组、高风险组和极高风险组。他们还分析了正常组织样本和癌旁组织样本。与 TCGA 的 RNA-Seq 数据结果关联分析表明, 远端和基因区的 DNA 甲基化在前列腺肿瘤发生中起着关键作用。它可能对 TSS 有积极或消极作用, 从而改变肿瘤中的基因调控。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{II} 系统

Clausen M. J., Melchers L. J., Mastik M. F., et al. Identification and validation of WISP1 as an epigenetic regulator of metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55:45-59.

Zhang X. L., Wu J., Wang J., et al. Integrative epigenomic analysis reveals unique epigenetic signatures involved in unipotency of mouse female germline stem cells. *Genome Biol*. 2016;17:162.

Locke W. J., Zotenko E., Stirzaker C., et al. Coordinated epigenetic remodelling of transcriptional networks occurs during early breast carcinogenesis. *Clin Epigenetics*. 2015;7:52.

相关试剂盒

Infinium HumanMethylation450 Arrays

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment

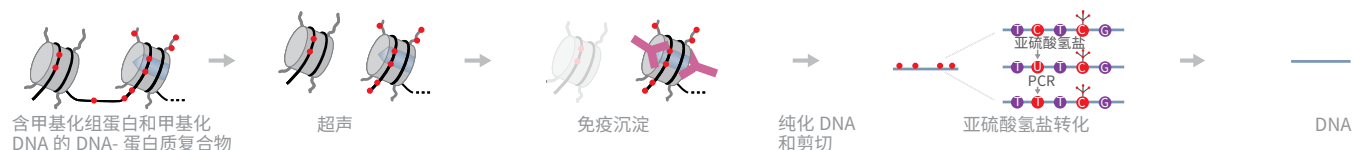
BisChIP-seq: 经亚硫酸氢盐处理的染色质免疫沉淀 DNA 测序

ChIP-BS-seq: 经亚硫酸氢盐处理的染色质的 ChIP- 亚硫酸氢盐测序

ChIP-BMS: 染色质免疫沉淀结合亚硫酸氢盐甲基化测序分析

BisChIP-seq、ChIP-BS-seq 和 ChIP-BMS 基本上都是指相同的方法。²¹⁵ 这是一种直接定量的方法，用于评估与染色质修饰或染色质相关因子有关的 DNA 甲基化模式。²¹⁶

ChIP 捕获步骤用于获得具有表观遗传学特征的基因组的部分片段。捕获的 DNA 片段要进行末端修复、甲基化接头连接、亚硫酸氢盐转化、PCR 扩增以及新一代测序。



BisChIP-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 5mC 在 CpG 密集区和重复区域的基因组水平覆盖度 MBD 蛋白不与 5hmC 相互作用 | <ul style="list-style-type: none"> 不能覆盖全基因组的 CpG 和非 CpG 甲基化；缺失 5mC 低密集度区域 和其他方法的单碱基分辨率相比，该方法的碱基对分辨率较低（约 150 bp） 基于蛋白质的选择对超甲基化区域有偏向性 |

综述

Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

Jin J., Lian T., Gu C., et al. The effects of cytosine methylation on general transcription factors. *Sci Rep.* 2016;6:29119.

作者利用 BisChIP-seq 研究了 3 个人类转录因子中非 CpG 甲基化对 DNA/ 蛋白质相互作用的影响。他们发现，糖皮质激素受体能识别细胞染色质内的高度甲基化位点。研究结论是，DNA 的非 CpG 甲基化可以通过直接影响转录因子的结合从而调控基因的表达。

illumina 技术: HiSeq 2000 系统

215. Plongthongkum N., Diep D. H. and Zhang K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet.* 2014;15:647-661.

216. Brinkman A. B., Gu H., Bartels S. J., et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res.* 2012;22:1128-1138.

Varshney D., Vavrova-Anderson J., Oler A. J., et al. SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nat Commun.* 2015;6:6569.

作者研究了 Alu 等短散在核元件 (SINE) 的甲基化, 探索甲基化对这些元件的反转录转座的影响。他们利用 ChIP-BS-seq 评估与 RNA 聚合酶 III (RNAPIII) 结合的 Alu SINE 的甲基化状态, 发现了高水平的 CpG 甲基化。这种 DNA 甲基化不会阻止 RNAPIII 与 Alu SINE 的结合, 而失去 DNA 甲基化对 SINE 到转录机器复合物的可及性几乎没有影响。因此得出结论, 组蛋白的甲基化而非 DNA 甲基化在抑制 SINE 转录方面起了主要作用。

Illumina 技术: HiSeq 系统

相关试剂盒

Infinium HumanMethylation450 Arrays

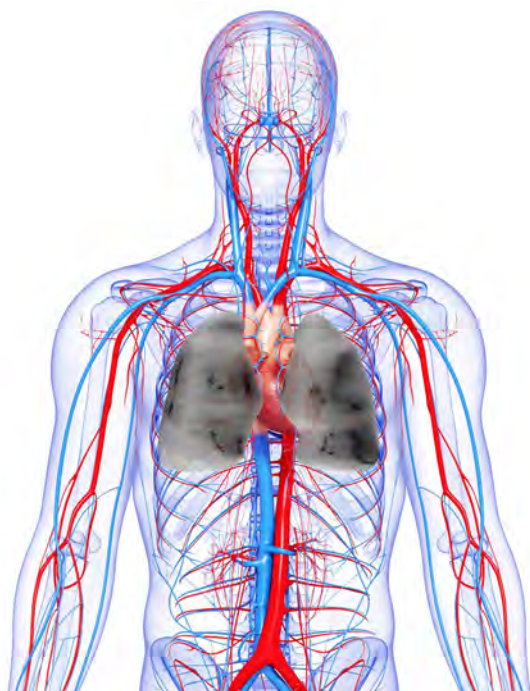
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment

DNA- 蛋白质相互作用

染色质重塑是一个动态过程，由能够改变蛋白质-DNA 相互作用的因子驱动。这些表观遗传学因子可参与蛋白质修饰，例如组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化。²¹⁷ 组蛋白修饰通过招募调节因子并维持开放或封闭的染色质状态，从而影响基因活化。表观遗传学因素在组织发育²¹⁸、胚胎发育、细胞命运、免疫应答以及癌症等疾病中起着一定作用。²¹⁹ 细菌性病原体可以通过染色质重塑引起免疫基因的转录抑制。²²⁰ DNA-蛋白质相互作用的研究也表明，染色质重塑能够响应外在因素，例如过度饮酒行为²²¹、吸烟²²² 和临床药物。



吸烟会扰乱蛋白质-DNA 相互作用，导致癌症或肺部疾病的发生。

综述

Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., et al. Next generation sequencing technology and genome-wide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:1-31.

Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma.* 2016;.

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

217. Rivera C. M. and Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell.* 2013;155:39-55.

218. Pinello L., Xu J., Orkin S. H. and Yuan G. C. Analysis of chromatin-state plasticity identifies cell-type-specific regulators of H3K27me3 patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:E344-353.

219. Yeh H. H., Young D., Gelovani J. G., et al. Histone deacetylase class II and acetylated core histone immunohistochemistry in human brains with Huntington's disease. *Brain Res.* 2013;1504:16-24.

220. Kahrstrom C. T. Epigenetics: Legionella makes its mark on histones. *Nat Rev Genet.* 2013;14:370.

221. Warnault V., Darceq E., Levine A., Barak S. and Ron D. Chromatin remodeling--a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Transl Psychiatry.* 2013;3:e231.

222. Marwick J. A., Kirkham P. A., Stevenson C. S., et al. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:633-642.

ChIP-Seq: 染色质免疫沉淀测序

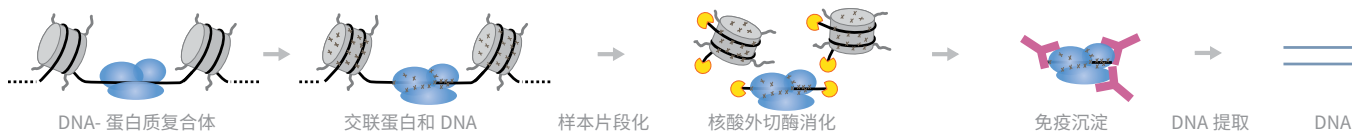
HT-ChIP: 高通量 ChIP

ChIP-exo: 核酸外切酶剪切 ChIP

Mint-ChIP: 多重 ChIP

ChIP-Seq 是一种定位特定蛋白质结合位点的成熟方法。²²³ 由该方法产生了各种各样的衍生方法, 如 AHT-ChIP-Seq²²⁴、BisChIP-Seq²²⁵、CAST-ChIP²²⁶、ChIP-BMS²²⁷、ChIP-BS-seq²²⁸、ChIPmentation²²⁹、Drop-ChIP²³⁰、Mint-ChIP²³¹、PAT-ChIP²³²、reChIP-seq²³³、scChIP-seq²³⁴ 和 X-ChIP²³⁵。连续 ChIP-seq (reChIP) 还能展示染色质上不同蛋白质之间的关联。²³⁶

在这种方法中, DNA-蛋白质复合体在体内交联。然后, 将样本片段化, 并用核酸外切酶处理, 修掉未结合的寡核苷酸。使用蛋白特异性抗体对 DNA-蛋白质复合体进行免疫沉淀。提取 DNA, 将其纯化并进行测序, 得到高分辨率的蛋白质结合位点序列。



ChIP-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 蛋白质结合位点的碱基级别分辨率 • 可定位具体的调节因子或蛋白质 • 核酸外切酶的使用消除了未结合的 DNA 造成的污染²³⁷ | <ul style="list-style-type: none"> • 非特异性抗体会稀释目标 DNA-蛋白质复合体 • 目标蛋白质必须是已知的, 并且能够产生抗体 |

综述

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

223. Solomon M. J., Larsen P. L. and Varshavsky A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell.* 1988;53:937-947.

224. Aldridge S., Watt S., Quail M. A., et al. AHT-ChIP-seq: a completely automated robotic protocol for high-throughput chromatin immunoprecipitation. *Genome Biol.* 2013;14:R124.

225. Statham A. L., Robinson M. D., Song J. Z., Coolen M. W., Stirzaker C. and Clark S. J. Bisulfite sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res.* 2012;22:1120-1127.

226. Schauer T., Schwale P. C., Handley A., Margulies C. E., Flicek P. and Ladurner A. G. CAST-ChIP maps cell-type-specific chromatin states in the Drosophila central nervous system. *Cell Rep.* 2013;5:271-282.

227. Li Y. and Tollefsbol T. O. Combined chromatin immunoprecipitation and bisulfite methylation sequencing analysis. *Methods Mol Biol.* 2011;791:239-251.

228. Brinkman A. B., Gu H., Bartels S. J., et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res.* 2012;22:1128-1138.

229. Schmid C., Rendeiro A. F., Sheffield N. C. and Bock C. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nat Methods.* 2015;12:963-965.

230. Rotem A., Ram O., Shores N., et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1165-1172.

231. van Galen P., Viny A. D., Ram O., et al. A Multiplexed System for Quantitative Comparisons of Chromatin Landscapes. *Mol Cell.* 2016;61:170-180.

232. Fanelli M., Amatori S., Barozzi I. and Minucci S. Chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing from paraffin-embedded pathology tissue. *Nat Protoc.* 2011;6:1905-1919.

233. Truax A. D. and Greer S. F. ChIP and Re-ChIP assays: investigating interactions between regulatory proteins, histone modifications, and the DNA sequences to which they bind. *Methods Mol Biol.* 2012;809:175-188.

234. Rotem A., Ram O., Shores N., et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1165-1172.

235. Skene P. J., Hernandez A. E., Groudine M. and Henikoff S. The nucleosomal barrier to promoter escape by RNA polymerase II is overcome by the chromatin remodeler Chd1. *Elife.* 2014;3:e02042.

236. Elsasser S. J., Noh K. M., Diaz N., Allis C. D. and Banaszynski L. A. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature.* 2015;522:240-244.

237. Zentner G. E. and Henikoff S. Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol.* 2012;13:250.

参考文献

Rinaldi L., Datta D., Serrat J., et al. Dnmt3a and Dnmt3b Associate with Enhancers to Regulate Human Epidermal Stem Cell Homeostasis. *Cell Stem Cell*. 2016;19:491-501.

成体干细胞中 DNA 甲基转移酶 Dnmt3a 和 Dnmt3b 的内源性功能是未知的。在本研究中，作者使用 ChIP-Seq 检测人类表皮干细胞，发现 Dnmt3a 和 Dnmt3b 以依赖于组蛋白 H3K36me3 的方式结合至最活跃的增强子，并且这是产生其相关增强子 RNA 所必需的。任何一种蛋白的消耗都会导致相应目标增强子活性的降低，并会显著影响表皮干细胞的功能。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Woolnough J. L., Atwood B. L., Liu Z., Zhao R. and Giles K. E. The Regulation of rRNA Gene Transcription during Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11:e0157276.

为了将 rRNA 合成的下调时间与 RNA 聚合酶 I 转录因子 UBTF 的结合进行比较，作者对未处理的 H9 ESC 进行了 ChIP-Seq。并比较了在用 TGFβ-β 家族成员 ACTIVIN A 处理 6 小时后与 H9 ESC 的结合情况。发现 ACTIVIN A 处理 6 小时后，UBTF 与 rRNA 基因的整体结合大约减少了 50%。这一结果与通过 32P 代谢标记测得的 rRNA 总合成减少量一致。

Illumina 技术：HiSeq 系统

Schmidt S. F., Madsen J. G., Frafjord K. O., et al. Integrative Genomics Outlines a Biphasic Glucose Response and a ChREBP-RORγ Axis Regulating Proliferation in beta Cells. *Cell Rep*. 2016;16:2359-2372.

Nelson D. M., Jaber-Hijazi F., Cole J. J., et al. Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. *Genome Biol*. 2016;17:158.

Wu T. P., Wang T., Seetin M. G., et al. DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*. 2016;532:329-333.

Zwart W., Flach K. D., Rudraraju B., et al. SRC3 Phosphorylation at Serine 543 Is a Positive Independent Prognostic Factor in ER-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22:479-491.

Yasuma K., Yasunaga J., Takemoto K., et al. HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005372.

De S., Mitra A., Cheng Y., Pfeifer K. and Kassis J. A. Formation of a Polycomb-Domain in the Absence of Strong Polycomb Response Elements. *PLoS Genet*. 2016;12:e1006200.

Bevington S. L., Cauchy P., Piper J., et al. Inducible chromatin priming is associated with the establishment of immunological memory in T cells. *EMBO J*. 2016;35:515-535.

Hay D., Hughes J. R., Babbs C., et al. Genetic dissection of the alpha-globin super-enhancer in vivo. *Nat Genet*. 2016;48:895-903.

Weiner A., Hsieh T. H., Appleboim A., et al. High-resolution chromatin dynamics during a yeast stress response. *Mol Cell*. 2015;58:371-386.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

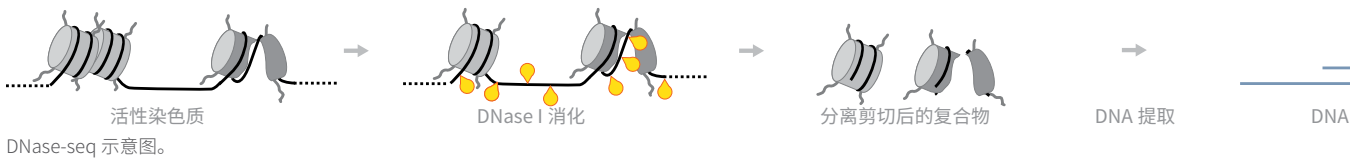
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

DNase I 超敏位点测序

DNase I 足迹法最初发表于 1978 年²³⁸，早于桑格测序和新一代测序。新一代测序的应用由 Boyle 等人于 2008 年²³⁹首次发表，随后被优化用于测序²⁴⁰。此外，还提供有高灵敏度实验方案（scDNase-seq）。²⁴¹

在这种方法中，用 DNase I 处理 DNA- 蛋白质复合物，随后提取 DNA 并测序。调节蛋白所结合的序列受到保护，不会被 DNase I 消化。深度测序提供了对基因组中调节蛋白位置的准确检测。在这种方法的变型中，DNA- 蛋白质复合物在 DNase I 消化前通过甲醛交联的方式进行固定。在 DNA 纯化前解除交联。在另一种被称为 GeF-seq 的修饰中，交联和 DNase I 消化都在通透化的细胞内进行。²⁴²



| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可检测“开放”染色质²⁴³• 不需要预先知道序列或结合的蛋白质• 与甲醛辅助性调控元件分离和测序（FAIRE-seq）相比，在启动子区具有更高的灵敏度²⁴⁴ | <ul style="list-style-type: none">• DNase I 具有序列特异性，并且超敏位点可能不能对整个基因组起作用²⁴⁵• 多个纯化步骤中的 DNA 损失降低了灵敏度²⁴⁶• 将 DNase I 与 ChIP 数据整合对于识别和区分相似的蛋白质结合位点很有必要 |

综述

Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F. O., Brooks M. J., et al. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:1-31.

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

参考文献

Qiu Z., Li R., Zhang S., et al. Identification of Regulatory DNA Elements Using Genome-wide Mapping of DNase I Hypersensitive Sites during Tomato Fruit Development. *Mol Plant.* 2016;9:1168-1182.

作者研究了番茄果实的发育和成熟机制，它们由调控元件对转录因子的可及性精确控制。他们利用 DNase-seq 针对番茄品种“MoneyMaker”果实组织创建了基因组水平具有阶段特异性的高分辨率 DNase I 超敏位点图谱。研究人员将该数据与开花期和分裂期后 20 天时得到的基因表达谱数据相结合，显示了染色质可及性以及果实发育开端的表达变化。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

238. Galas D. J. and Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 1978;5:3157-3170.

239. Boyle A. P., Davis S., Shulha H. P., et al. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.* 2008;132:311-322.

240. Anderson S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Res.* 1981;9:3015-3027.

241. Jin W., Tang Q., Wan M., et al. Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples. *Nature.* 2015;528:142-146.

242. Chumsakul O., Nakamura K., Kurata T., et al. High-resolution mapping of in vivo genomic transcription factor binding sites using in situ DNase I footprinting and ChIP-seq. *DNA Res.* 2013;20:325-338.

243. Zentner G. E. and Henikoff S. Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol.* 2012;13:250.

244. Kumar V., Muratani M., Rayan N. A., et al. Uniform, optimal signal processing of mapped deep-sequencing data. *Nat Biotechnol.* 2013;31:615-622.

245. Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

246. Lu F., Liu Y., Inoue A., Suzuki T., Zhao K. and Zhang Y. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell.* 2016;165:1375-1388.

Frank C. L., Manandhar D., Gordan R. and Crawford G. E. HDAC inhibitors cause site-specific chromatin remodeling at PU.1-bound enhancers in K562 cells. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:15.

作者利用 DNase-seq 和 RNA-Seq 检验了 K562 细胞对组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (HDACi) 的亚致死处理的响应变化。当细胞增殖变慢时, 数千个基因调控元件中的染色质可及性提高或降低。这些变化与邻近基因表达变化同时发生, 表示可能存在增强子元件激活或失活事件。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Lu F., Liu Y., Inoue A., Suzuki T., Zhao K., et al. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell*. 2016;165:1375-1388.

作者利用 DNase-seq 生成了小鼠胚胎植入前胚胎从单细胞到桑椹胚期的 DNase I 超敏位点图谱。他们的数据揭示了在小鼠胚胎植入前发育中染色质可及性的动态变化。他们还确定了参与建立哺乳动物生命早期调控环境的关键转录因子。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Badal S. S., Wang Y., Long J., et al. miR-93 regulates Msk2-mediated chromatin remodeling in diabetic nephropathy. *Nat Commun*. 2016;7:12076.

作者运用 DNase I 消化来评估在高糖 (HG) 条件下培养的足细胞中 miR-93 调控的 DNase I 超敏变化。miR-93 过表达时, 许多 HG 相关 DNase I 超敏位点发生逆转。部分超敏位点位于在糖尿病性肾病发展中很关键的一些基因的 TSS。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Adar S., Hu J., Lieb J. D. and Sancar A. Genome-wide kinetics of DNA excision repair in relation to chromatin state and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E2124-2133.

Bevington S. L., Cauchy P., Piper J., Bertrand E., Lalli N., et al. Inducible chromatin priming is associated with the establishment of immunological memory in T cells. *EMBO J*. 2016;35:515-535.

Browne J. A., Yang R., Eggen S. E., Leir S. H. and Harris A. HNF1 regulates critical processes in the human epididymis epithelium. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;425:94-102.

Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F. O., Brooks M. J., et al. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res*. 2016;55:1-31.

Corces M. R., Buenrostro J. D., Wu B., Greenside P. G., Chan S. M., et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet*. 2016;48:1193-1203.

Georgakilas G., Vlachos I. S., Zagganas K., et al. DIANA-miRGen v3.0: accurate characterization of microRNA promoters and their regulators. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D190-195.

Lensing S. V., Marsico G., Hansel-Hertsch R., et al. DSBCapture: *in situ* capture and sequencing of DNA breaks. *Nat Methods*. 2016;13:855-857.

Metser G., Shin H. Y., Wang C., et al. An autoregulatory enhancer controls mammary-specific STAT5 functions. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:1052-1063.

Schmidt S. F., Madsen J. G., Frafjord K. O., Poulsen L., Salo S., et al. Integrative Genomics Outlines a Biphasic Glucose Response and a ChREBP-RORgamma Axis Regulating Proliferation in beta Cells. *Cell Rep*. 2016;16:2359-2372.

Shin H. Y., Willi M., Yoo K. H., et al. Hierarchy within the mammary STAT5-driven Wap super-enhancer. *Nat Genet*. 2016;48:904-911.

Thompson B., Varticovski L., Baek S. and Hager G. L. Genome-Wide Chromatin Landscape Transitions Identify Novel Pathways in Early Commitment to Osteoblast Differentiation. *PLoS One*. 2016;11:e0148619.

Yang R., Kerschner J. L., Gosalia N., et al. Differential contribution of cis-regulatory elements to higher order chromatin structure and expression of the CFTR locus. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:3082-3094.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

DNase I SIM: DNase I 简化的植物核内方法

这种方法是专用于植物的简化 DNase I 实验方案。其中包括一个附加步骤：在 DNase I 消化前用 Percoll 梯度法进行核纯化，以便更高效地去除细胞碎片和淀粉颗粒。DNase I 消化后直接在核中使用 T4 DNA 聚合酶进行 DNA 末端补平。这些额外的步骤避免了凝胶纯化和相应的材料损失。



DNase I SIM 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需进行凝胶纯化 | <ul style="list-style-type: none">• 仅针对植物进行优化 |

综述

尚无。

参考文献

Cumbie J. S., Filichkin S. A. and Megraw M. Improved DNase-seq protocol facilitates high resolution mapping of DNase I hypersensitive sites in roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*. 2015;11:42.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

MNase-Seq: 微球菌核酸酶测序

MAINE-Seq: 微球菌核酸酶辅助性核小体分离

Nucleo-Seq: 分离核小体测序

Nuc-seq: 分离核小体测序

微球菌核酸酶 (MNase) 来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，在 1975 年首次用于确定染色质结构，当时这种方法被称为核或染色质的金黄色葡萄球菌核酸酶或微球菌核酸酶消化。^{247,248} 随着新一代测序技术的出现，MNase 消化²⁴⁹ 越来越受欢迎，最终创造了术语 MNase-Seq。²⁵⁰ 微球菌核酸酶辅助性核小体分离测序 (MAINE-seq) 而 <4079^{251,252}、Nucleo-Seq²⁵⁴ 和 Nuc-seq 这些术语并不常用。融合到目标蛋白质的 MNase 还被用于钙依赖性裂解，以便在体内研究特定基因组位点 (ChEC-seq)。²⁵⁵

在 MNase-Seq 中，用 MNase 处理 gDNA。染色质蛋白所结合的序列受到保护，不会被 MNase 消化。然后，从 DNA-蛋白质复合物提取 DNA，用于制备测序文库。深度测序提供了对调节蛋白和基因组中 DNA 结合的位置的精准检测。²⁵⁶



MNase-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可定位核小体及其他 DNA 结合蛋白• 可追踪小到约 25bp 的亚核小体颗粒保护²⁵⁸• 确定基因组中各种调节蛋白的位置• 覆盖了广泛的调节位点 | <ul style="list-style-type: none">• MNase 位点可能不能对整个基因组起作用• 基于 AT 的测序偏差²⁵⁹• 将 MNase 与 ChIP 数据整合对于识别和区分相似蛋白质结合位点很有必要 |

综述

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

247. Sollner-Webb B. and Felsenfeld G. A comparison of the digestion of nuclei and chromatin by staphylococcal nuclease. *Biochemistry.* 1975;14:2915-2920.

248. Axel R. Cleavage of DNA in nuclei and chromatin with staphylococcal nuclease. *Biochemistry.* 1975;14:2921-2925.

249. Schones D. E., Cui K., Cuddapah S., et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell.* 2008;132:887-898.

250. Kuan P. F., Huebert D., Gasch A. and Keles S. A non-homogeneous hidden-state model on first order differences for automatic detection of nucleosome positions. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2009;8:Article29.

251. Cusick M. E., Herman T. M., DePamphilis M. L. and Wassarman P. M. Structure of chromatin at deoxyribonucleic acid replication forks: prenucleosomal deoxyribonucleic acid is rapidly excised from replicating simian virus 40 chromosomes by micrococcal nuclease. *Biochemistry.* 1981;20:6648-6658.

252. Ponts N., Harris E. Y., Prudhomme J., et al. Nucleosome landscape and control of transcription in the human malaria parasite. *Genome Res.* 2010;20:228-238.

253. Valouev A., Johnson S. M., Boyd S. D., Smith C. L., Fire A. Z. and Sidow A. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature.* 2011;474:516-520.

254. Chodavarapu R. K., Feng S., Bernatavichute Y. V., et al. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature.* 2010;466:388-392.

255. Zentner G. E., Kasinathan S., Xin B., Rohs R. and Henikoff S. ChEC-seq kinetics discriminates transcription factor binding sites by DNA sequence and shape in vivo. *Nat Commun.* 2015;6:8733.

256. Schones D. E., Cui K., Cuddapah S., et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell.* 2008;132:887-898.

257. Zentner G. E. and Henikoff S. Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol.* 2012;13:250.

258. Henikoff J. G., Belsky J. A., Krassovsky K., MacAlpine D. M. and Henikoff S. Epigenome characterization at single base-pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:18318-18323.

259. Kensche P. R., Hooijmakers W. A., Toenhake C. G., et al. The nucleosome landscape of Plasmodium falciparum reveals chromatin architecture and dynamics of regulatory sequences. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:2110-2124.

参考文献

Lavender C. A., Cannady K. R., Hoffman J. A., et al. Downstream Antisense Transcription Predicts Genomic Features That Define the Specific Chromatin Environment at Mammalian Promoters. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006224.

作者对 T47D/A1-2 细胞进行了 MNase-Seq, 以研究反义转录和核小体定位之间的相互作用。结果显示, 核小体相对于所识别的全部 3 类 TSS 作用位置有规律。就像基因 TSS 一样, MNase-Seq read 密度与紧靠 daTSS 和 uaTSS 下游定位的 “+1” 核小体一致, 尽管在以 daTSS 位置为中心时, MNase-Seq 峰并不尖锐。

Illumina 技术: HiSeq 系统、MiSeq 系统

Rube H. T., Lee W., Hejna M., et al. Sequence features accurately predict genome-wide MeCP2 binding *in vivo*. *Nat Commun.* 2016;7:11025.

作者利用 MNase-Seq 研究体内野生型嗅上皮组织中核小体的基因组定位。表达的基因在转录起始位点有明显的核小体抑制区。转录终止位点也有核小体抑制现象。将 MNase-Seq 和甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) ChIP-Seq 数据结合分析, 发现 MeCP2 峰值与核小体优先共存。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

de Dieuleveult M., Yen K., Hmitou I., et al. Genome-wide nucleosome specificity and function of chromatin remodellers in ES cells. *Nature.* 2016;530:113-116.

本研究利用 MNase-Seq 为小鼠 ESC 的染色质重塑子 Chd1、Chd2、Chd4、Chd6、Chd8、Chd9、Brg1 和 Ep400 创建了全基因组重塑子-核小体相互作用图谱。在 Ep400 缺失后, 作者检测到 MNase 耐受性提高, 尤其是在 -1 核小体中, Ep400 在受到正调控和负调控的基因中均富集。这一效应在 H3K4me3 启动子中最为明显, 与二价启动子相比, 前者的 Ep400 结合水平较高。作者认为, Ep400 可能会因此改变 -1 核小体的结构。

Illumina 技术: Genome Analyzer_{II} 系统

Cole H. A., Cui F., Ocampo J., et al. Novel nucleosomal particles containing core histones and linker DNA but no histone H1. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:573-581.

Deniz O., Flores O., Aldea M., Soler-Lopez M. and Orozco M. Nucleosome architecture throughout the cell cycle. *Sci Rep.* 2016;6:19729.

Devaiah B. N., Case-Borden C., Gegonne A., et al. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23:540-548.

Johnson G. D., Jodar M., Pique-Regi R. and Krawetz S. A. Nuclease Footprints in Sperm Project Past and Future Chromatin Regulatory Events. *Sci Rep.* 2016;6:25864.

Kensche P. R., Hoeijmakers W. A., Toenhake C. G., Bras M., Chappell L., et al. The nucleosome landscape of Plasmodium falciparum reveals chromatin architecture and dynamics of regulatory sequences. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:2110-2124.

Lombrana R., Alvarez A., Fernandez-Justel J. M., et al. Transcriptionally Driven DNA Replication Program of the Human Parasite Leishmania major. *Cell Rep.* 2016;16:1774-1786.

Maehara K. and Ohkawa Y. Exploration of nucleosome positioning patterns in transcription factor function. *Sci Rep.* 2016;6:19620.

Matveeva E., Maiorano J., Zhang Q., et al. Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing. *Cell Discov.* 2016;2:15046.

Mieczkowski J., Cook A., Bowman S. K., et al. MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility. *Nat Commun.* 2016;7:11485.

Ramakrishnan S., Pokhrel S., Palani S., et al. Counteracting H3K4 methylation modulators Set1 and Jhd2 co-regulate chromatin dynamics and gene transcription. *Nat Commun.* 2016;7:11949.

Wang M., Wang P., Tu L., et al. Multi-omics maps of cotton fibre reveal epigenetic basis for staged single-cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:4067-4079.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

FiT-Seq: 固定组织的染色质免疫沉淀测序

FiT-seq 是一种从福尔马林固定、石蜡包埋组织样本 (FFPE) 中提取可溶性染色质以用于检测组蛋白结合位点的方法。²⁶⁰ 该方法的主要特点是在超声处理步骤之前的蛋白酶 K 消化步骤, 用于逆转 FFPE 组织重度交联固定染色质的影响。



FiT-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 用于福尔马林固定、石蜡包埋样本• 比病理组织的染色质免疫沉淀 (PAT-ChIP) 的分辨率和灵敏度更高 | <ul style="list-style-type: none">• 未在其他实验室中测试• 超声处理可能会导致测序偏差²⁶¹ |

综述

尚无。

参考文献

Cejas P., Li L., O'Neill N. K., Duarte M., Rao P., et al. Chromatin immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nat Med.* 2016;22:685-691.

作者使用已保存 2 至 15 年 (中位数 8 年) 的人类临床样本测试 FiT-seq。他们能稳定地评估各种组蛋白标记, 并生成与细胞系和新鲜冷冻肿瘤组织相似的染色质状态图谱。

Illumina 技术: NextSeq 500 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

260. Cejas P., Li L., O'Neill N. K., et al. Chromatin immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nat Med.* 2016;22:685-691.

261. Teytelman L., Ozaydin B., Zill O., et al. Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One.* 2009;4:e6700.

PAT-ChIP: 病理学组织的染色质免疫沉淀

PAT-ChIP 是 ChIP-Seq 的变型, 经优化用于分析来自福尔马林固定、石蜡包埋样本的染色质。该方法的主要特点是用二甲苯替代品 (Histolemon, Carlo Erba) 脱蜡, 然后进行 MNase 消化和超声处理。²⁶²FiT-seq 对这种方法进行了进一步完善。²⁶³



PAT-ChIP 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 作用于福尔马林固定、石蜡包埋样本 | <ul style="list-style-type: none">• 实验方案耗时长, 需要 4 天• 产出低²⁵⁹• 超声处理可能会导致测序偏差²⁶⁴ |

综述

Mimura I., Kanki Y., Kodama T. and Nangaku M. Revolution of nephrology research by deep sequencing: ChIP-seq and RNA-seq. *Kidney Int.* 2014;85:31-38.

参考文献

Cejas P., Li L., O'Neill N. K., Duarte M., Rao P., et al. Chromatin immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nat Med.* 2016;22:685-691.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

262. Fanelli M., Amatori S., Barozzi I. and Minucci S. Chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing from paraffin-embedded pathology tissue. *Nat Protoc.* 2011;6:1905-1919.

263. Cejas P., Li L., O'Neill N. K., et al. Chromatin immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nat Med.* 2016;22:685-691.

264. Teytelman L., Ozaydin B., Zill O., et al. Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One.* 2009;4:e6700.

X-ChIP-seq：高分辨率交联染色质免疫沉淀测序

交联染色质免疫沉淀（X-ChIP）是染色质研究中的基础技术。^{265,266} 随着新一代测序技术的出现，这种被称为“X-ChIP-seq”的简单技术能够获得高分辨率结果。²⁶⁷

该方法包括将细胞与 1% 的甲醛在室温下处理 10 分钟与使染色质 DNA 交联。用裂解缓冲液清洗和重悬细胞。经 MNase 消化后，染色质经短时间的超声处理而破碎，然后进行染色质免疫沉淀。提取 DNA，富集短片段，然后用于制备测序文库。



X-ChIP-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">单碱基分辨率 | <ul style="list-style-type: none">超声处理可能会导致测序偏差²⁶⁸捕获蛋白质-DNA 相互作用没有考虑到时间因素²⁶⁹ |

综述

Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;15:814-827.

参考文献

Schmidt S. V., Krebs W., Ulas T., et al. The transcriptional regulator network of human inflammatory macrophages is defined by open chromatin. *Cell Res.* 2016;26:151-170.

为了确定在长时间暴露于典型巨噬细胞刺激下，人类巨噬细胞是如何通过组蛋白修饰的长期变化而改变转录的，作者进行了转录组分析和 ChIP-Seq。他们利用 X-ChIP-seq 研究了 4 种组蛋白修饰：H3K4me1（增强子）、H3K4me3（启动子）、H3K27ac（活化染色质状态）和 H3K27me3（静态增强子和启动子）。他们能够确定一个转录和表观遗传调节子（TR）的独特网络，其特点是可用的启动子，而不依赖于激活信号。研究结果支持这样的模型：在炎症过程中巨噬细胞的活化主要通过预先确定的 TR 网络在转录水平进行调控。

Illumina 技术：HiSeq 1000 系统

Elsasser S. J., Noh K. M., Diaz N., Allis C. D. and Banaszynski L. A. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature.* 2015;522:240-244.

作者在小鼠 ESC 中利用天然 ChIP-Seq 和 X-ChIP-seq 研究由组蛋白修饰介导的 TE 亚群——内源性逆转录元件（ERV）——沉默。他们在包含重复区域的整个小鼠基因组中识别了 79,532 个 H3.3 富集区域。H3.3 与活化染色质状态和抑制染色质状态相关。大多数 H3.3 峰值位于基因区和增强子等基因间调控区，但 23% 散布于异染色质区。作者得出结论，他们的结果确证了 H3.3 在控制小鼠基因组的 ERV 反转录转座中的重要作用。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

265. Breiling A., Turner B. M., Bianchi M. E. and Orlando V. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature.* 2001;412:651-655.

266. Negre N. and Cavalli G. Finding Downstream Target DNAs for Chromatin Proteins by X-ChIP in Drosophila. *Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking.* 2001;

267. Skene P. J. and Henikoff S. A simple method for generating high-resolution maps of genome-wide protein binding. *Elife.* 2015;4:e09225.

268. Teytelman L., Ozaydin B., Zill O., et al. Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One.* 2009;4:e6700.

269. Zentner G. E., Kasinathan S., Xin B., Rohs R. and Henikoff S. ChEC-seq kinetics discriminates transcription factor binding sites by DNA sequence and shape *in vivo.* *Nat Commun.* 2015;6:8733.

ORGANIC: 亲和纯化获得的天然分离染色质基因组中被占据的区域

ORGANIC 是一种不涉及交联和超声处理的温和实验方案。²⁷⁰ 该方法结合了 MNase-Seq 和 native ChIP，可提供复杂真核生物基因组中染色质所在区域的准确谱图。



ORGANIC 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 避免了因超声处理导致的偏差²⁷¹• 避免了交联杂峰²⁷² | <ul style="list-style-type: none">• 蛋白质可能溶解较差²⁷³• Mnase 导致的序列偏差²⁷⁴• 核分离可能引入杂峰• 未在其他实验室中重现 |

综述

Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;15:814-827.

参考文献

Kasinathan S., Orsi G. A., Zentner G. E., Ahmad K. and Henikoff S. High-resolution mapping of transcription factor binding sites on native chromatin. *Nat Methods.* 2014;11:203-209.

Zentner G. E. and Henikoff S. Mot1 redistributes TBP from TATA-containing to TATA-less promoters. *Mol Cell Biol.* 2013;33:4996-5004.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

270. Kasinathan S., Orsi G. A., Zentner G. E., Ahmad K. and Henikoff S. High-resolution mapping of transcription factor binding sites on native chromatin. *Nat Methods.* 2014;11:203-209.

271. Teytelman L., Ozaydin B., Zill O., et al. Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One.* 2009;4:e6700.

272. Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;15:814-827.

273. Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;15:814-827.

274. Kensche P. R., Hoeijmakers W. A., Toenhake C. G., et al. The nucleosome landscape of *Plasmodium falciparum* reveals chromatin architecture and dynamics of regulatory sequences. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:2110-2124.

ATAC-Seq: 转座酶可及性染色质测序

Fast-ATAC: 针对血细胞优化的 ATAC-seq

ATAC-Seq 利用 Tn5 转座子检测基因组中无核小体的区域。²⁷⁵ 该方法很常用, 优化后的实验方案用于各种组织, 如血液 (Fast-ATAC)²⁷⁶、神经元²⁷⁷、生物库标本²⁷⁸ 以及单细胞 (scATAC-seq²⁷⁹ 和单细胞 ATAC-seq²⁸⁰)。

在该方法中, 将 gDNA 与 Tn5 转座子一起孵育, 该转座子将会在开放染色质区域中使 gDNA 片段化, 同时加入接头。纯化区域的深度测序提供了基因组中无核小体区域的碱基级别分辨率。



ATAC-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 两步实验方案, 不包含接头连接、凝胶纯化或交联逆转的步骤 • 与 FAIRE-Seq 相比, 信噪比高 | <ul style="list-style-type: none"> • 在样本的操作处理中, 结合的染色质区域可能会开放并被转座子标记 • 仅一半的分子含有 PCR 扩增所需方向的接头。 • 接头位点之间的距离可能不是 PCR 扩增的最佳距离²⁸¹ |

综述

Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F. O., Brooks M. J., et al. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:1-31.

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

275. Buenrostro J. D., Giresi P. G., Zaba L. C., Chang H. Y. and Greenleaf W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods.* 2013;10:1213-1218.

276. Corces M. R., Buenrostro J. D., Wu B., et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet.* 2016;48:1193-1203.

277. Milani P., Escalante-Chong R., Shelley B. C., et al. Cell freezing protocol suitable for ATAC-Seq on motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:25474.

278. Scharer C. D., Blalock E. L., Barwick B. G., et al. ATAC-seq on biobanked specimens defines a unique chromatin accessibility structure in naive SLE B cells. *Sci Rep.* 2016;6:27030.

279. Buenrostro J. D., Wu B., Litzenburger U. M., et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature.* 2015;523:486-490.

280. Cusanovich D. A., Daza R., Adey A., et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science.* 2015;348:910-914.

281. Sos B. C., Fung H. L., Gao D. R., et al. Characterization of chromatin accessibility with a transposome hypersensitive sites sequencing (THS-seq) assay. *Genome Biol.* 2016;17:20.

参考文献

Bogdanovic O., Smits A. H., de la Calle Mustienes E., Tena J. J., Ford E., et al. Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet.* 2016;48:417-426.

作者研究了斑马鱼胚胎在种系特征性发育阶段中的表观遗传修饰。他们观察了与保守调控路径相关的数千个增强子的广泛 Tet 依赖性 DNA 脱甲基化。作者对 tet1-tet2-tet3 吗啡啉突变斑马鱼胚胎进行了 ATAC-seq 和全基因组甲基化组图谱分析，并证实了 DNA 甲基化在这些保守基因组元件中的上游调控作用。

Illumina 技术: HiSeq 1500 系统

Corces M. R., Buenrostro J. D., Wu B., Greenside P. G., Chan S. M., et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet.* 2016;48:1193-1203.

本研究利用 Fast-ATAC 创建了总共 137 个样本中 13 类人类原代血细胞的染色质可及性和转录谱图。急性骨髓性白血病 (AML) 细胞的单细胞 ATAC-seq 显示了与不同发育阶段 (可能由 HOX 因子引起) 对应的独特混合调控组谱。作者认为, 这些结果可能会为造血发育和疾病提供一些启示。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统、HiSeq 2500 系统、NextSeq 500 系统

Miller C. L., Pjanic M., Wang T., et al. Integrative functional genomics identifies regulatory mechanisms at coronary artery disease loci. *Nat Commun.* 2016;7:12092.

作者检验了人类冠状动脉平滑肌细胞 (HCASMC) 中表观遗传学机制的调控作用, 以深入了解冠状动脉疾病的发展。他们利用 ATAC-seq 得到了经多种生长因子刺激的原代培养 HCASMC 以及正常的和动脉粥样硬化的人类冠状动脉组织的表观基因组图谱。他们将数据与转录因子结合和 H3K27ac ChIP-Seq 数据整合, 确定 HCASMC 富集的顺式调控机制。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Wu J., Huang B., Chen H., et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos. *Nature.* 2016;534:652-657.

作者利用 ATAC-seq 和 CRISPR/Cas9 辅助的 mtDNA 缺失得到了小鼠胚胎植入前胚胎中的可及性染色质的基因组水平谱图。他们发现, 虽然 DNA 甲基化组中有很多亲代不对称的情况, 但是在主要接合子基因组活化后亲代基因组之间的染色质可及性普遍相当。

Illumina 技术: HiSeq 1500 系统、HiSeq 2500 系统

Ackermann A. M., Wang Z., Schug J., Najj A. and Kaestner K. H. Integration of ATAC-seq and RNA-seq identifies human alpha cell and beta cell signature genes. *Mol Metab.* 2016;5:233-244.

Atianand M. K., Hu W., Satpathy A. T., et al. A Long Noncoding RNA lincRNA-EPS Acts as a Transcriptional Brake to Restrain Inflammation. *Cell.* 2016;165:1672-1685.

Boukhaled G. M., Cordeiro B., Deblois G., et al. The Transcriptional Repressor Polycomb Group Factor 6, PCGF6, Negatively Regulates Dendritic Cell Activation and Promotes Quiescence. *Cell Rep.* 2016;16:1829-1837.

de Dieuleveult M., Yen K., Hmitou I., Depaux A., Boussouar F., et al. Genome-wide nucleosome specificity and function of chromatin remodellers in ES cells. *Nature.* 2016;530:113-116.

Flynn R. A., Do B. T., Rubin A. J., et al. 7SK-BAF axis controls pervasive transcription at enhancers. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23:231-238.

George J., Uyar A., Young K., et al. Leukaemia cell of origin identified by chromatin landscape of bulk tumour cells. *Nat Commun.* 2016;7:12166.

Han D., Lu X., Shih A. H., et al. A Highly Sensitive and Robust Method for Genome-wide 5hmC Profiling of Rare Cell Populations. *Mol Cell.* 2016;63:711-719.

Hay D., Hughes J. R., Babbs C., Davies J. O., Graham B. J., et al. Genetic dissection of the alpha-globin super-enhancer in vivo. *Nat Genet.* 2016;48:895-903.

Kaaij L. J., Mokry M., Zhou M., Musheev M., Geeven G., et al. Enhancers reside in a unique epigenetic environment during early zebrafish development. *Genome Biol.* 2016;17:146.

Kaufman C. K., Mosimann C., Fan Z. P., et al. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science.* 2016;351:aad2197.

Koues O. I., Collins P. L., Cella M., et al. Distinct Gene Regulatory Pathways for Human Innate versus Adaptive Lymphoid Cells. *Cell.* 2016;165:1134-1146.

Lu F., Liu Y., Inoue A., Suzuki T., Zhao K., et al. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell.* 2016;165:1375-1388.

Proudhon C., Snetkova V., Raviram R., et al. Active and Inactive Enhancers Cooperate to Exert Localized and Long-Range Control of Gene Regulation. *Cell Rep.* 2016;15:2159-2169.

Rendeiro A. F., Schmid C., Strefford J. C., et al. Chromatin accessibility maps of chronic lymphocytic leukaemia identify subtype-specific epigenome signatures and transcription regulatory networks. *Nat Commun.* 2016;7:11938.

Sebe-Pedros A., Ballare C., Parra-Acero H., et al. The Dynamic Regulatory Genome of Capsaspora and the Origin of Animal Multicellularity. *Cell.* 2016;165:1224-1237.

Shih H. Y., Sciume G., Mikami Y., et al. Developmental Acquisition of Regulomes Underlies Innate Lymphoid Cell Functionality. *Cell*. 2016;165:1120-1133.

Smith J. D., Suresh S., Schlecht U., et al. Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide *RNA design*. *Genome Biol*. 2016;17:45.

Wang L., Siegenthaler J. A., Dowell R. D. and Yi R. Foxc1 reinforces quiescence in self-renewing hair follicle stem cells. *Science*. 2016;351:613-617.

Wang W., Org T., Montel-Hagen A., et al. MEF2C protects bone marrow B-lymphoid progenitors during stress haematopoiesis. *Nat Commun*. 2016;7:12376.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

THS-seq: 转座体超敏位点测序

THS-seq 是一种鉴定染色质可及性的高度灵敏的方法。这种 ATAC-seq 的变型方法采用了可及性 DNA 末端的线性扩增、体外转录以及经改造的 Tn5 超级突变体。²⁸²



THS-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">需要的起始材料很少可检测远端增强子附近的小区域 | <ul style="list-style-type: none">需要经改造的转座酶 |

综述

尚无。

参考文献

Sos B. C., Fung H. L., Gao D. R., Osothprapong T. F., Kia A., et al. Characterization of chromatin accessibility with a transposome hypersensitive sites sequencing (THS-seq) assay. *Genome Biol.* 2016;17:20.

作者开发了 THS-seq 来消除 ATAC-seq 的局限性。他们在 100 个 GM12878 类淋巴瘤细胞中证实了 THS-seq 灵敏度的提高，每个细胞约得到 110,000 个独特易位事件。与发表的 ENCODE ATAC-seq 数据相比，THS-seq 在灵敏度方面提高了约 500 倍。

Illumina 技术：MiSeq 系统、HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

282. Sos B. C., Fung H. L., Gao D. R., et al. Characterization of chromatin accessibility with a transposome hypersensitive sites sequencing (THS-seq) assay. *Genome Biol.* 2016;17:20.

CATCH-IT: 共价连接标签以捕获组蛋白和鉴定周转

CATCH-IT 是一种用于测量基因组中核小体周转动力学的直接方法。²⁸³

在该方法中，用甲硫氨酸替代品叠氮高丙氨酸（Aha）短暂处理细胞，将生物素偶联到含有新掺入的组蛋白的核小体。使用链霉亲和素对标记的染色质进行亲和纯化，严格清洗以去除非组蛋白蛋白质，并使用 tiling 芯片进行分析。



CATCH-IT 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">可确定基因组中核小体周转的差异 | <ul style="list-style-type: none">可能有杂峰 |

综述

Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;15:814-827.

参考文献

Skene P. J., Hernandez A. E., Groudine M. and Henikoff S. The nucleosomal barrier to promoter escape by RNA polymerase II is overcome by the chromatin remodeler Chd1. *Elife.* 2014;3:e02042.

本研究调查了小鼠胚胎成纤维细胞中染色质重塑蛋白 Chd1 与活性转录区域的相互作用。作者利用 CATCH-IT 证明了组蛋白周转在启动子两侧的核小体处最快，并朝向基因体逐渐减少。在表达显性负突变 (K510R-Chd1) 时，TSS 两侧的核小体周转明显减少，但在基因体内大幅增加。作者得出结论，虽然 Chd1 对组蛋白动力学既有正面影响又有负面影响，但是它调控多能性和重编程。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Weber C. M., Ramachandran S. and Henikoff S. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell.* 2014;53:819-830.

作者利用 CATCH-IT 确定组蛋白变异 H2A.Z 如何调节 RNAPII 动力学。他们发现 H2A.Z 的占位性与完全核小体周转反相关。CATCH-IT 将核小体周转的测量转换为 H3 和 H4 的测量，而不是 H2A 或 H2B，这说明 H2A.Z-H2B 二聚体有助于保留 (H3-H4)₂ 四聚体。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Perez-Lluch S., Blanco E., Tilgner H., et al. Absence of canonical marks of active chromatin in developmentally regulated genes. *Nat Genet.* 2015;47:1158-1167.

Teves S. S. and Henikoff S. Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21:88-94.

Yildirim O., Hung J. H., Cedeno R. J., et al. A system for genome-wide histone variant dynamics in ES cells reveals dynamic MacroH2A2 replacement at promoters. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004515.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

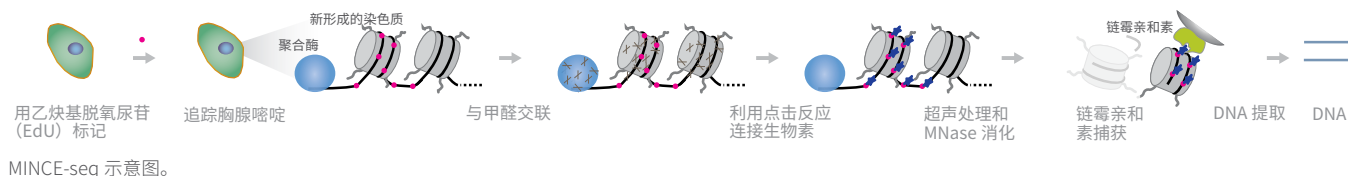
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

283. Deal R. B., Henikoff J. G. and Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science.* 2010;328:1161-1164.

MINCE-seq: 利用 EdU 体内定位新生染色质

MINCE-seq 专用于以高时空分辨率表征复制叉之后的核小体及其他染色质蛋白在基因组中的位置。²⁸⁴

在该方法中,使用核苷酸类似物 EdU 标记新复制的 DNA,EdU 通过点击化学反应与生物素偶联。与生物素偶联确保了不同期的细胞中新复制 DNA 的高特异性纯化,即使只是总 DNA 的一小部分也能保证效果。后续的 MNase 处理回收了与核小体和非组蛋白 DNA 结合蛋白质相结合的 DNA 片段,从而能够以接近碱基级别的分辨率对新复制的染色质进行定位。²⁸³



| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">以接近碱基对级别的分辨率定位新复制的染色质 | <ul style="list-style-type: none">可靠性未知 |

综述

尚无。

参考文献

Ramachandran S. and Henikoff S. *Transcriptional Regulators Compete with Nucleosomes Post-replication. Cell.* 2016;165:580-592.

作者利用 MINCE-seq 证明果蝇启动子和增强子处的典型染色质特性在复制时丢失了。具有高水平的 RNAPII 停滞和 DNA 可及性的启动子表现出 Brahma (BRM) 重塑因子的特异性富集。在复制过程中,增强子染色质也被破坏了,说明转录因子竞争在核小体重建中具有一定作用。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

284. Ramachandran S. and Henikoff S. *Transcriptional Regulators Compete with Nucleosomes Post-replication. Cell.* 2016;165:580-592.

FAIRE-seq: 甲醛辅助性调控元件分离 Sono-Seq: 超声处理交联染色质测序

FAIRE-seq^{285,286} 和 Sono-Seq²⁸⁷ 以 DNA 与核小体或序列特异性 DNA 结合蛋白质之间的交联效率差异为基础。

在这种方法中,用甲醛使 DNA-蛋白质复合体在体内短暂交联。然后,对样本进行裂解和超声处理。经过酚/氯仿提取后,纯化水相中的 DNA 并进行测序。测序可提供有关未被组蛋白占据的 DNA 区域的信息。²⁸³



FAIRE-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 简单、重现性高的实验方案 无需使用抗体 无需使用诸如 DNase、MNase 的酶,避免了酶处理过程所需的操作步骤 不需要进行单细胞悬浮或核分离,因此适用于组织样本²⁸⁸ | <ul style="list-style-type: none"> 不能识别与 DNA 结合的调节蛋白 DNase-Seq 可能更有利于识别高度表达基因的核小体缺失的启动子²⁸⁹ |

综述

Yan H., Tian S., Slager S. L., Sun Z. and Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omics Technologies. *Am J Epidemiol.* 2016;183:96-109.

参考文献

Lavender C. A., Cannady K. R., Hoffman J. A., Trotter K. W., Gilchrist D. A., et al. Downstream Antisense Transcription Predicts Genomic Features That Define the Specific Chromatin Environment at Mammalian Promoters. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006224.

作者利用 FAIRE-seq 鉴定了 T47D/A1-2 细胞中 DNA 的可及区域,并且发现在下游反义转录起始位点 (daTSS) 位置处具有开放的基因组区域。ChIP-Seq 数据表明,daTSS 与反式调控因子的序列特性一致,也与开放且富含蛋白质结合区域的序列特性一致。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统、MiSeq 系统

Behura S. K., Sarro J., Li P., et al. High-throughput cis-regulatory element discovery in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 2016;17:341.

作者运用 FAIRE-seq 评估了登革热病毒易感性 (Moyo-S) 和抗感染型 (Moyo-R) 蚊子品系中调控元件的遗传变异。已知转录因子一致性结合位点在 FAIRE 峰值富集,其中 FoxA1、Hunchback、Gfi、Klf4、MYB/ph3 和 Sox9 是最主要的。体内测试的所有元件都被确认可在转基因果蝇报告基因实验分析中促进基因表达。最近在 Moyo-S 和 Moyo-R 蚊子品系中确定的 > 13,000 个 SNP 中,有 3365 个定位于 FAIRE 峰值。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

285. Giressi P. G. and Lieb J. D. Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). *Methods.* 2009;48:233-239.

286. Hogan G. J., Lee C. K. and Lieb J. D. Cell cycle-specified fluctuation of nucleosome occupancy at gene promoters. *PLoS Genet.* 2006;2:e158.

287. Auerbach R. K., Euskirchen G., Rozowsky J., et al. Mapping accessible chromatin regions using Sono-Seq. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:14926-14931.

288. Simon J. M., Giressi P. G., Davis I. J. and Lieb J. D. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc.* 2012;7:256-267.

289. Song L., Zhang Z., Grasfeder L. L., et al. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res.* 2011;21:1757-1767.

Verfaillie A., Imrichova H., Atak Z. K., et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun.* 2015;6:6683.

为确定顺式调控区域是否为黑色素瘤侵入性和增殖性转录状态的基础，作者对黑色素瘤细胞培养中激活的（H3K27ac）和抑制的（H3K27me3）染色质标记进行了 FAIRE-seq 和 ChIP-Seq。基于 H3K27ac 成簇和 FAIRE-seq 图说明了在 SOX10 高表达的 9 个增殖性样本中具有活化的开放 SOX10 启动子。在 2 个侵入性培养物中，SOX10 启动子缺少激活标记，但具有抑制性 H3K27me3 标记。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Ackermann A. M., Wang Z., Schug J., Naji A. and Kaestner K. H. Integration of ATAC-seq and RNA-seq identifies human alpha cell and beta cell signature genes. *Mol Metab.* 2016;5:233-244.

de Dieuleveult M., Yen K., Hmitou I., Depaux A., Boussouar F., et al. Genome-wide nucleosome specificity and function of chromatin remodellers in ES cells. *Nature.* 2016;530:113-116.

Du J., Leung A., Trac C., et al. Chromatin variation associated with liver metabolism is mediated by transposable elements. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:28.

Fabrizius A., Andre D., Laufs T., et al. Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals. *Neuroscience.* 2016;337:339-354.

Nevedomskaia E., Stelloo S., van der Poel H. G., et al. Androgen receptor DNA binding and chromatin accessibility profiling in prostate cancer. *Genom Data.* 2016;7:124-126.

Bicker A., Brahmer A. M., Meller S., et al. The Distinct Gene Regulatory Network of Myoglobin in Prostate and Breast Cancer. *PLoS One.* 2015;10:e0142662.

Davie K., Jacobs J., Atkins M., et al. Discovery of transcription factors and regulatory regions driving *in vivo* tumor development by ATAC-seq and FAIRE-seq open chromatin profiling. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004994.

Naval-Sanchez M., Potier D., Hulselmans G., Christiaens V. and Aerts S. Identification of Lineage-Specific Cis-Regulatory Modules Associated with Variation in Transcription Factor Binding and Chromatin Activity Using Ornstein-Uhlenbeck Models. *Mol Biol Evol.* 2015;32:2441-2455.

Reschen M. E., Gaulton K. J., Lin D., et al. Lipid-induced epigenomic changes in human macrophages identify a coronary artery disease-associated variant that regulates PPAP2B Expression through Altered C/EBP-beta binding. *PLoS Genet.* 2015;11:e1005061.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

NOMe-Seq: 核小体占位甲基化组测序

NOMe-Seq 是单分子高分辨率核小体定位分析。²⁹⁰ 该方法利用 GpC 甲基转移酶 M.CviPI 让未与核小体结合的 GpC 位点甲基化的能力, 来构建核小体定位的数字足迹。M.CviPI 可以绘制 CpG 很少的启动子中的核小体位置, 而不管其内源性甲基化状态。

在这种方法中, 用 M.CviPI 处理原生的染色质, 然后再用亚硫酸氢钠处理 DNA 并进行 WGBS。通过这些数据, 可以确定 CpG 甲基化模式和无核小体区域 (GpC 甲基化)。²⁹¹



NOMe-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">高分辨率 | <ul style="list-style-type: none">依赖于 GpC 残基的存在²⁹² |

综述

Shull A. Y., Noonepalle S. K., Lee E. J., Choi J. H. and Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-651.

参考文献

Wallner S., Schroder C., Leitao E., Berulava T., Haak C., et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:33.

作者利用 NOMe-Seq 研究了 DMR 的染色质可及性在分化过程中是否改变。单核细胞具有 89,212 个 NOMe-Seq 峰, 覆盖约 21 Mbp, 而巨噬细胞具有 127,267 个 NOMe-Seq 峰, 覆盖约 42 Mbp, 这说明巨噬细胞的核小体缺失区域更多。对分化过程中得到或丢失的 DMR 和 NOMe-Seq 峰的进一步分析表明, 在分化过程中大多数 DMR 发生核小体缺失。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Lay F. D., Liu Y., Kelly T. K., et al. The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. *Genome Res.* 2015;25:467-477.

Statham A. L., Taberlay P. C., Kelly T. K., Jones P. A. and Clark S. J. Genome-wide nucleosome occupancy and DNA methylation profiling of four human cell lines. *Genom Data.* 2015;3:94-96.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

290. Han H., Cortez C. C., Yang X., Nichols P. W., Jones P. A. and Liang G. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet.* 2011;20:4299-4310.

291. Wallner S., Schroder C., Leitao E., et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:33.

292. Ishii H., Kadonaga J. T. and Ren B. MPE-seq, a new method for the genome-wide analysis of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E3457-3465.

ChIPmentation: 染色质免疫沉淀结合基于 Tn5 转座酶的测序文库制备

ChIPmentation 结合了 ChIP 和 Tn5 转座酶测序文库制备 (标签片段化) 技术。²⁹³ ATAC-seq 和 ChIPmentation 可以在同一个试验中有效地结合使用, 分别检测开放染色质和蛋白质结合序列。²⁹⁴ 这种方法组合充分利用了在制备文库时使用 Tn5 转座酶所带来的灵活性和高效率。

标签片段化直接在与微珠结合的免疫沉淀染色质上进行, 然后采用标准的文库制备方法。



ChIPmentation 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">可以由少至 10,000 个细胞生成准确的图谱简单的一步反应 | <ul style="list-style-type: none">未见报道 |

综述

尚无。

参考文献

Rendeiro A. F., Schmidl C., Strefford J. C., Walewska R., Davis Z., et al. Chromatin accessibility maps of chronic lymphocytic leukaemia identify subtype-specific epigenome signatures and transcription regulatory networks. *Nat Commun.* 2016;7:11938.

作者研究了慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的表观遗传失调。通过 ChIPmentation 和 RNA-Seq 得到的染色质图谱准确地预测了 CLL。作者还研究了 CLL 临床生物标记物 IGHV 基因的突变状态。IGHV 突变与 IGHV 未突变样本的相关基因调控网络分别可识别低侵入性和高侵入性 CLL 亚型之间的特征性差异。

Illumina 技术: HiSeq 3000/4000 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

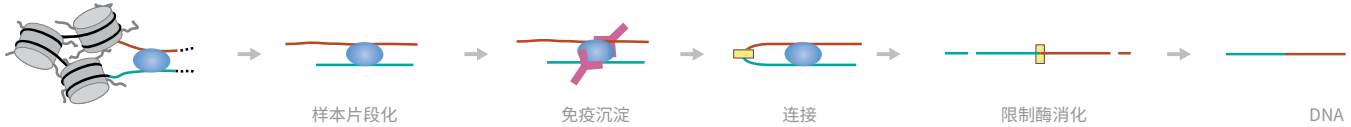
293. Schmidl C., Rendeiro A. F., Sheffield N. C. and Bock C. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nat Methods.* 2015;12:963-965.

294. Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F. O., Brooks M. J. and Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:1-31.

ChIA-PET：基于双端标记测序的染色质相互作用分析

ChIA-PET 的特点是通过一个免疫沉淀步骤分析长片段 DNA 相互作用，类似于 Hi-C。^{295,296} 在这种方法中，DNA-蛋白质复合物交联并片段化。使用特异性抗体对目标蛋白质进行免疫沉淀。将沉淀下来的 DNA 片段分为两等份，各加一个独特的条形码，然后邻位自连。自连后的 DNA 用限制酶消化，然后测序。深度测序为连接的片段提供了碱基对级别的分辨率。Hi-C 和 ChIA-PET 用于分析长片段相互作用，并达到了了人类基因组中分辨率和合理覆盖度的最佳平衡。²⁹⁷

Tang 等人发表了名为高级或长 read ChIA-PET 的改进实验方案。²⁹⁸ 该方法用 2 个半接头和一个生物素化接头连接取代了 2 个独立的连接反应。然后，只需要一步即可对去交联的纯化 DNA 进行片段化并使用 Tn5 转座酶连接接头。最后，将 DNA 进行 PCR 扩增和测序。²⁹⁹



ChIA-PET 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 适用于全面检测大量的长片段和短片段染色质相互作用³⁰⁰• 研究特定蛋白质或蛋白质复合体的相互作用• 通过 ENCODE 项目可使用公共 ChIA-PET 数据库³⁰¹• 去除了传统 ChIP 实验分析中产生的背景• 免疫沉淀步骤降低了数据复杂性¹¹³ | <ul style="list-style-type: none">• 需要大量的起始样本，通常至少要 1 亿个细胞³⁰²• 非特异性抗体可能会沉降不需要的蛋白质复合物，从而造成污染• 接头可以自连接，与真正的 DNA 相互作用混淆• 灵敏度有限，可检测到低至 10% 的相互作用¹¹³ |

综述

Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;

参考文献

Ricano-Ponce I., Zhenakova D. V., Deelen P., et al. Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs. *J Autoimmun.* 2016;68:62-74.

作者对 629 个血液样本转录组数据进行了系统分析，并将与 14 种自体免疫性疾病相关的 460 个 SNP 关联起来。SNP 关联到功能性调控元件，形成一个模型，其中自体免疫性疾病基因由染色质循环 / 非编码 RNA 相互作用的网络调控。B 类淋巴瘤细胞的 ChIA-PET 分析数据表明，多基因 SNP (70%) 比单基因 SNP (55%) 更经常参与 B 细胞中的循环相互作用。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

295. Li G., Fullwood M. J., Xu H., et al. ChIA-PET tool for comprehensive chromatin interaction analysis with paired-end tag sequencing. *Genome Biol.* 2010;11:R22.

296. Fullwood M. J., Liu M. H., Pan Y. F., et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature.* 2009;462:58-64.

297. Dekker J., Marti-Renom M. A. and Mirny L. A. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat Rev Genet.* 2013;14:390-403.

298. Tang Z., Luo O. J., Li X., et al. CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription. *Cell.* 2015;163:1611-1627.

299. Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;

300. Saján S. A. and Hawkins R. D. Methods for identifying higher-order chromatin structure. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:59-82.

301. Consortium E. P. A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.* 2011;9:e1001046.

302. Mumbach M. R., Rubin A. J., Flynn R. A., et al. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. *Nat Methods.* 2016;13:919-922.

Chang H., Liu Y., Xue M., et al. Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:2514-2527.

Darabi H., Beesley J., Droit A., et al. Fine scale mapping of the 17q22 breast cancer locus using dense SNPs, genotyped within the Collaborative Oncological Gene-Environment Study (COGS). *Sci Rep.* 2016;6:32512.

Fujimoto A., Furuta M., Totoki Y., et al. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat Genet.* 2016;48:500-509.

Tewhey R., Kotliar D., Park D. S., et al. Direct Identification of Hundreds of Expression-Modulating Variants using a Multiplexed Reporter Assay. *Cell.* 2016;165:1519-1529.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

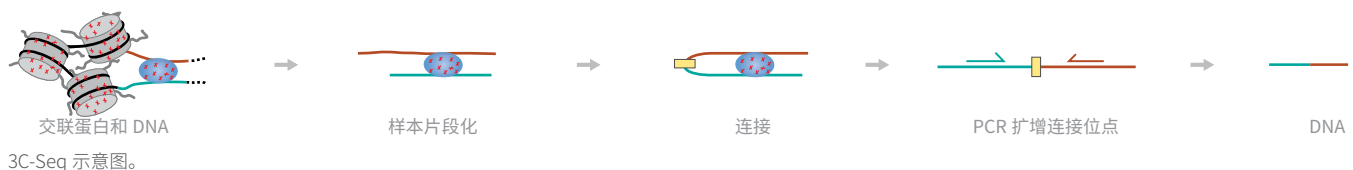
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

3-C、Capture-C 和 Hi-C：染色质构象捕获测序

3C-Seq³⁰³、Capture-C 和 Hi-C³⁰⁴ 构成了用于分析染色质相互作用的系列方法。Capture-C 在 3C 方法的基础上增加了使用磁珠对生物素标记片段的额外分离。对 Capture-C 方法进行了全新改进 (NG Capture-C)。³⁰⁵Hi-C 方法扩展了 3C-Seq，可在基因组水平定位染色质接触点，也被用于研究原位染色质相互作用。^{306,307}

在这种方法中，用甲醛使 DNA-蛋白质复合体交联。将样本片段化，然后提取 DNA、连接，并用限制酶消化。得到的 DNA 片段进行 PCR 扩增并测序。深度测序为连接的片段提供了碱基对级别的分辨率。



| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 能够检测长片段 DNA 相互作用• 高通量方法 | <ul style="list-style-type: none">• 检测可能会受到随机染色体碰撞的影响• 实际上会有不到 1% 的 DNA 片段产生连接产物³⁰⁸• 由于步骤多，该方法需要大量的起始样本材料 |

综述

Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;.

Turaev D. and Rattei T. High definition for systems biology of microbial communities: metagenomics gets genome-centric and strain-resolved. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;39:174-181.

参考文献

Criscione S. W., De Cecco M., Siranosian B., et al. Reorganization of chromosome architecture in replicative cellular senescence. *Sci Adv*. 2016;2:e1500882.

作者利用 Hi-C、荧光原位杂交 (FISH)、计算机模拟建模方法研究了增殖细胞、休眠细胞和衰老细胞中的间期染色体的 3D 架构。直接测量基因位点之间的距离、染色体体积和染色质可及性，结果表明，Hi-C 相互作用变化是由单个染色体臂所占体积的显著减少而导致。然而，着丝粒与这种整体压缩趋势相反，增加体积。

Illumina 技术：HiSeq 2500 系统

Darrow E. M., Huntley M. H., Dudchenko O., et al. Deletion of DXZ4 on the human inactive X chromosome alters higher-order genome architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E4504-4512.

在间期，失活 X 染色体 (Xi) 大部分在转录水平是沉默的，其采用一种不寻常的 3D 构造，称为“巴氏小体”。作者构建了人 GM12878 细胞的二倍体 Hi-C 谱图，证明 Xi 染色体具有独特的超结构。它包含超级域，这是一种异常大的接触域。还包含非常大的染色质环，称为“超级环”。超级域和超级环都跨越了基因组的数十兆碱基。诸如微卫星重复序列 DXZ4 的超级环锚定子常常同时定位。删除 Xi 上的 DXZ4 会导致超级域和超级环消失、区室化模式改变并且染色质标记分布变化。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

303. Duan Z., Andronescu M., Schutz K., et al. A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods*. 2012;58:277-288.

304. Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326:289-293.

305. Davies J. O., Telenius J. M., McGowan S. J., et al. Multiplexed analysis of chromosome conformation at vastly improved sensitivity. *Nat Methods*. 2016;13:74-80.

306. Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;

307. Rao S. S., Huntley M. H., Durand N. C., et al. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 2014;159:1665-1680.

308. Bourgo R. J., Singhal H. and Greene G. L. Capture of associated targets on chromatin links long-distance chromatin looping to transcriptional coordination. *Nat Commun*. 2016;7:12893.

Krijger P. H., Di Stefano B., de Wit E., et al. Cell-of-Origin-Specific 3D Genome Structure Acquired during Somatic Cell Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2016;18:597-610.

作者利用 4 种生成细胞类型及其相应的 P3 和 P20 iPSC 衍生物的 Hi-C 接触谱图来研究重编程过程中细胞核组织的变化。他们发现早期传代 iPSC 携带了拓扑特征，可由此识别它们细胞的起源。这些特征不是体细胞染色体拓扑结构的残余。这些独特的拓扑特征是在重编程过程中获得的。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Veluchamy A., Jegu T., Ariel F., et al. LHP1 Regulates H3K27me3 Spreading and Shapes the Three-Dimensional Conformation of the Arabidopsis Genome. *PLoS One*. 2016;11:e0158936.

诸如异染色质蛋白 1 (LHP1) 控制活性转录基因, 它是最初在果蝇中鉴定出的植物特异性多梳家族蛋白 (PcG)。作者利用 Hi-C 绘制了野生型和 lhp1 植物的拟南芥基因组不同部分的染色质中基因的空间接触和分布。100 kb 分辨率的染色体接触谱图显示出野生型和 lhp1 植物之间的显著变化。另外的实验表明, LHP1 负责 H3K27me3 向基因体 3' 端的延伸。作者还鉴定了 LHP1 活化基因的亚群, 该亚群形成局部染色质拓扑结构以控制转录共调控。

Illumina 技术: HiSeq 2500 系统

Acemel R. D., Tena J. J., Irastorza-Azcarate I., et al. A single three-dimensional chromatin compartment in amphioxus indicates a stepwise evolution of vertebrate Hox bimodal regulation. *Nat Genet*. 2016;48:336-341.

Bigot P., Colli L. M., Machiela M. J., et al. Functional characterization of the 12p12.1 renal cancer-susceptibility locus implicates BHLHE41. *Nat Commun*. 2016;7:12098.

Capurso D., Bengtsson H. and Segal M. R. Discovering hotspots in functional genomic data superposed on 3D chromatin configuration reconstructions. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:2028-2035.

Gunnell A., Webb H. M., Wood C. D., et al. RUNX super-enhancer control through the Notch pathway by Epstein-Barr virus transcription factors regulates B cell growth. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:4636-4650.

Kim K. D., Tanizawa H., Iwasaki O. and Noma K. Transcription factors mediate condensin recruitment and global chromosomal organization in fission yeast. *Nat Genet*. 2016;48:1242-1252.

Petryk N., Kahlil M., d'Aubenton-Carafa Y., et al. Replication landscape of the human genome. *Nat Commun*. 2016;7:10208.

Pichugin T., Sugawara T., Kaykov A., et al. A diffusion model for the coordination of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Sci Rep*. 2016;6:18757.

Putnam N. H., O'Connell B. L., Stites J. C., et al. Chromosome-scale shotgun assembly using an *in vitro* method for long-range linkage. *Genome Res*. 2016;26:342-350.

Rocha P. P., Raviram R., Fu Y., et al. A Damage-Independent Role for 53BP1 that Impacts Break Order and Igh Architecture during Class Switch Recombination. *Cell Rep*. 2016;16:48-55.

Tjong H., Li W., Kalhor R., et al. Population-based 3D genome structure analysis reveals driving forces in spatial genome organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E1663-1672.

Ulianov S. V., Khrameeva E. E., Gavrilov A. A., et al. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Res*. 2016;26:70-84.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

NG Capture-C: 新一代 Capture-C

NG Capture-C 是 3C-Seq³⁰⁹ 和 Hi-C³¹⁰ 的改进版。它代表了用于分析染色质相互作用的一系列方法。NG Capture-C 在 3C 方法的基础上增加了多个使用磁珠沉降生物素标记片段的步骤。

该实验方案利用甲醛固定，然后用限制酶消化和连接，形成约 10 kb 的多联体。提取 DNA 并超声处理。加入标签接头，混合样本，通过沉降进行纯化，然后进行 PCR 扩增。沉降和 PCR 步骤可以重复进行，以生成多达百万倍的富集。³¹¹



NG Capture-C 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">高灵敏度，可检测顺式和反式相互作用需要的样本起始量低与 capture-C 相比，经超声处理的捕获片段降低了成本经超声处理的捕获片段作为 UMI，减少了 PCR 偏差 | <ul style="list-style-type: none">未见报道 |

综述

Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;.

参考文献

Davies J. O., Telenius J. M., McGowan S. J., Roberts N. A., Taylor S., et al. Multiplexed analysis of chromosome conformation at vastly improved sensitivity. *Nat Methods*. 2016;13:74-80.

作者利用 NG Capture-C 检测连接点，相当于以单限制性片段的分辨率（约 250 bp）检测细胞中万分之一的相互作用。结果发现，检测灵敏度和分辨率高于现有的 3C 方法和 FISH 等补充方法。

Illumina 技术：HiSeq 系统、MiSeq 系统

Hay D., Hughes J. R., Babbs C., Davies J. O., Graham B. J., et al. Genetic dissection of the alpha-globin super-enhancer in vivo. *Nat Genet*. 2016;48:895-903.

作者利用同源重组得到 7 个小鼠模型，将所提出的 α 珠蛋白超级增强子的各个组分单独地或成对的删除，以便仔细分析其功能。NG Capture-C 只检测到发生在 α 珠蛋白启动子区域的统计上显著的变化。

Illumina 技术：NextSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

309. Duan Z., Andronescu M., Schutz K., et al. A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods*. 2012;58:277-288.

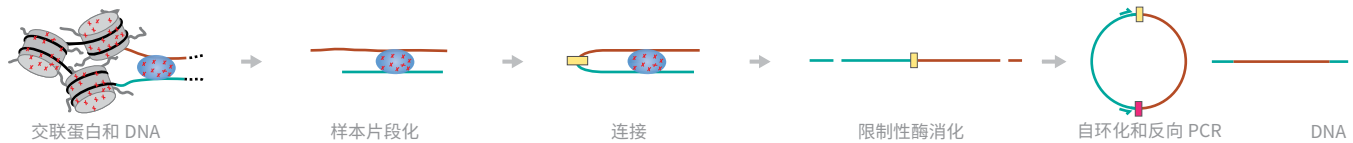
310. Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326:289-293.

311. Davies J. O., Telenius J. M., McGowan S. J., et al. Multiplexed analysis of chromosome conformation at vastly improved sensitivity. *Nat Methods*. 2016;13:74-80.

4C-seq: 环状染色质构象捕获

4C³¹² 也称为 4C-seq, 是类似于 3C 的方法, 有时又称作循环 3C。它实现了无偏差地检测与特定目标区域相互作用的所有基因组区域。³¹³

在这种方法中, 用甲醛使 DNA-蛋白质复合体交联。将样本片段化, 然后进行 DNA 连接和消化。得到的 DNA 片段自循环, 然后进行反向 PCR 和测序。深度测序为连接的片段提供了碱基对级别的分辨率。



4C 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 评估单独基因组位点 DNA 接触特性的优选策略• 可重复性高的数据 | <ul style="list-style-type: none">• 会丢失目标区域的局部相互作用 (< 50 kb)• 大环不能有效扩增 |

综述

尚无。

参考文献

Cai M., Kim S., Wang K., et al. 4C-seq revealed long-range interactions of a functional enhancer at the 8q24 prostate cancer risk locus. *Sci Rep.* 2016;6:22462.

基因组水平的关联研究已鉴定出 > 100 个前列腺癌的独立易感性基因位点, 包括 8q24 处的“热点”。为确定基因组中与该热点相互作用的对应点, 作者在 LNCaP 和 C4-2B 细胞系中将 4C-seq 偶联到 8q24 的增强子, 作为“诱饵”。通过 4C 确定的区域分布在开放细胞核区室, 具有活性组蛋白标记 H3K4me1、H3K4me2 和 H3K27Ac。

Illumina 技术: HiSeq 2000 系统

Loviglio M. N., Leleu M., Mannik K., et al. Chromosomal contacts connect loci associated with autism, BMI and head circumference phenotypes. *Mol Psychiatry.* 2016;.

作者利用 4C-seq 确定了与自闭症谱系及其他疾病相关的基因启动子物理相连的染色体区域, 包括 MVP、KCTD13、ALDOA、TBX6 和 MAPK3。他们发现位于 16p11.2 的 2 个拷贝数变异易发区域相互参与复杂的染色质成环, 并经 4C-seq、FISH 和 Hi-C 成功确认。研究表明, 破坏 16p11.2 处的染色质相互作用可能会对观察到的表型具有一定影响。

Illumina 技术: HiSeq 系统

Yang R., Kerschner J. L., Gosalia N., Neems D., Gorsic L. K., et al. Differential contribution of cis-regulatory elements to higher order chromatin structure and expression of the CFTR locus. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:3082-3094.

作者利用 CRISPR/Cas9 编辑顺式调控元件和小干扰 RNA (siRNA) 介导的结构蛋白缺失, 以确定结构元件和增强子对囊性纤维化跨膜电导调节子 (CFTR) 位点更高级结构和表达的相对贡献。他们利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术介导删除了 CFTR 位点 CTCF 结合绝缘子元件 5' 和一个关键的内含子增强子, 然后进行 4C-seq。研究结果与跨位点协调调控元件的机制一致, 说明结构性扰动可维持正常基因表达。但是, 他们发现 CFTR 转录的关键内含子增强子缺失可能无法通过位点的结构变化来挽回。

Illumina 技术: HiSeq 系统

312. Zhao Z., Tavoosidana G., Sjolinder M., et al. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet.* 2006;38:1341-1347.

313. Sajan S. A. and Hawkins R. D. Methods for identifying higher-order chromatin structure. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:59-82.

Acemel R. D., Tena J. J., Irastorza-Azcarate I., Marletaz F., Gomez-Marin C., et al. A single three-dimensional chromatin compartment in amphioxus indicates a stepwise evolution of vertebrate Hox bimodal regulation. *Nat Genet.* 2016;48:336-341.

De S., Mitra A., Cheng Y., Pfeifer K. and Kassiss J. A. Formation of a Polycomb-Domain in the Absence of Strong Polycomb Response Elements. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006200.

Eckart N., Song Q., Yang R., et al. Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. *PLoS One.* 2016;11:e0157086.

Kaaij L. J., Mokry M., Zhou M., Musheev M., Geeven G., et al. Enhancers reside in a unique epigenetic environment during early zebrafish development. *Genome Biol.* 2016;17:146.

Kandaswamy R., Sava G. P., Speedy H. E., et al. Genetic Predisposition to Chronic Lymphocytic Leukemia Is Mediated by a BMF Super-Enhancer Polymorphism. *Cell Rep.* 2016;16:2061-2067.

Lin C. Y., Erkek S., Tong Y., et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature.* 2016;530:57-62.

Proudhon C., Snetkova V., Raviram R., Lobry C., Badri S., et al. Active and Inactive Enhancers Cooperate to Exert Localized and Long-Range Control of Gene Regulation. *Cell Rep.* 2016;15:2159-2169.

Rocha P. P., Raviram R., Fu Y., Kim J., Luo V. M., et al. A Damage-Independent Role for 53BP1 that Impacts Break Order and Igh Architecture during Class Switch Recombination. *Cell Rep.* 2016;16:48-55.

Vermunt M. W., Tan S. C., Castelljns B., et al. Epigenomic annotation of gene regulatory alterations during evolution of the primate brain. *Nat Neurosci.* 2016;19:494-503.

Wang Q., Sawyer I. A., Sung M. H., et al. Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nat Commun.* 2016;7:10966.

Wani A. H., Boettiger A. N., Schorderet P., et al. Chromatin topology is coupled to Polycomb group protein subnuclear organization. *Nat Commun.* 2016;7:10291.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

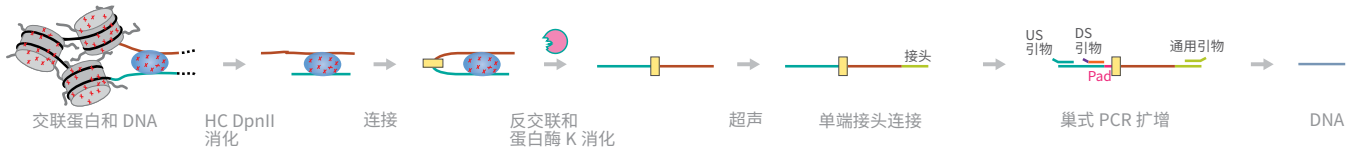
TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

UMI-4C：环状染色质构象捕获结合唯一分子标识

这种方法是 4C 法的变体，利用 UMI 得到高复杂性的定量的染色体接触特性，且信噪比受控。³¹⁴ 它是用于分析目标基因位点的高效且准确的方法。该方法与用于分析数据的软件配套使用 (<https://bitbucket.org/tanaylab/umi4cpackage>)。



UMI-4C 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">灵敏度和特异性提高多重分析实现了基因位点和条件之间相互作用位置分布的有效的比较 | <ul style="list-style-type: none">未见报道 |

综述

尚无。

参考文献

Schwartzman O., Mukamel Z., Oded-Elkayam N., Olivares-Chauvet P., Lubling Y., et al. UMI-4C for quantitative and targeted chromosomal contact profiling. *Nat Methods*. 2016;13:685-691.

作者描述了 4C-UMI 方法，指出这种方法需要适度的测序深度（每个诱饵 100,000 read）。该方法可轻松进行多重分析，可以选择多个视角。

Illumina 技术：MiSeq 系统、NextSeq 系统、HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

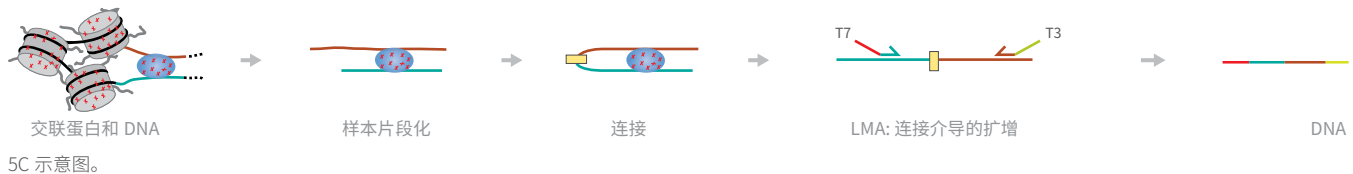
Nextera XT DNA Library Prep Kit

314. Schwartzman O., Mukamel Z., Oded-Elkayam N., et al. UMI-4C for quantitative and targeted chromosomal contact profiling. *Nat Methods*. 2016;13:685-691.

5C：染色质构象捕获碳拷贝

5C³¹⁵ 实现了多重测序之间相互作用的同时测定，是 3C 的高通量版³¹⁶。

在这种方法中，用甲醛使 DNA-蛋白质复合体交联。样本片段化，然后进行 DNA 连接，并用限制酶消化。得到的 DNA 片段通过连接介导 PCR 扩增，然后测序。深度测序为连接的片段提供了碱基对级别的分辨率。



| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">与 4C 不同，5C 为多对位点提供了相互作用频率的模型³¹⁷可用于重新构建更大基因组区域的（平均）3D 构象¹²⁰ | <ul style="list-style-type: none">需要调控位点的先验信息³¹⁸检测可能并不意味染色体的相互作用，也有可能是由随机碰撞导致的不能检测需要大量引物扩增的基因组研究 |

综述

Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;.

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell*. 2015;58:586-597.

参考文献

Smith E. M., Lajoie B. R., Jain G. and Dekker J. Invariant TAD Boundaries Constrain Cell-Type-Specific Looping Interactions between Promoters and Distal Elements around the CFTR Locus. *Am J Hum Genet*. 2016;98:185-201.

整体而言，染色体被分为活性区室和失活区室，而在基因水平，环相互作用将启动子连接到调控元件。拓扑相关结构域（TAD）代表了组织的中间水平。作者设计了 5C 实验，研究了目标区域中含有 TSS 的 HindIII 片段与其他 HindIII 限制性片段（远端片段）之间的环相互作用。研究结果显示，所有细胞类型中都存在同样的 TAD 界限，说明 TAD 代表着一种普遍的染色体结构。

Illumina 技术：Genome Analyzer_{IIx} 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

315. Dostie J. and Dekker J. Mapping networks of physical interactions between genomic elements using 5C technology. *Nat Protoc*. 2007;2:988-1002.

316. Sajan S. A. and Hawkins R. D. Methods for identifying higher-order chromatin structure. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:59-82.

317. de Wit E. and de Laat W. A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev*. 2012;26:11-24.

318. Sati S. and Cavalli G. Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma*. 2016;.

Pu-seq: 聚合酶测序

Pu-seq 可直接提供复制起点位置和效率数据, 也可提供对复制时间的间接估计。³¹⁹

对含有双链核糖核苷酸的 DNA 进行碱处理, 切割核糖的 3' 磷酸骨架, 得到 5' 羟基末端。如果变性 DNA 用作随机六聚体引物延伸的模板, 5' 到 3' 合成, 最后会得到一个平末端的核酸链。从单链 DNA 得到文库, 在每端放置不同的标签引物, 可将测序 read 定位到单个链, 以确定初始核苷酸的位置, 且准确度达到单碱基水平。³¹⁸



Pu-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 单碱基水平准确度 | <ul style="list-style-type: none">• 只适用于酵母 |

综述

尚无。

参考文献

Keszthelyi A., Daigaku Y., Ptasinska K., Miyabe I. and Carr A. M. Mapping ribonucleotides in genomic DNA and exploring replication dynamics by polymerase usage sequencing (Pu-seq). *Nat Protoc.* 2015;10:1786-1801.

作者利用 Pu-seq 确定了酵母中复制动力学, 详细程度很高。虽然研究复制动力学的其他方法提供了复制时间的直接测量和起始效率的间接估计, 但 Pu-seq 直接确定了初始效率。

Illumina 技术: NextSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

319. Daigaku Y., Keszthelyi A., Muller C. A., et al. A global profile of replicative polymerase usage. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22:192-198.

PB-seq: 蛋白质 /DNA 结合后进行高通量测序

PB-seq 是一种 DNA 结合检测方法，可在没有染色质的情况下分析基因组水平的 DNA- 蛋白质结合情况³²⁰。它属于常被称为指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 的一类方法。³²¹

对基因组 DNA 进行超声处理、片段大小选择和纯化。与 DNA 结合蛋白质杂交后，分离出蛋白质结合的 DNA，提取 DNA，制备用于测序。



PB-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 无需染色质结构就可确定结合效率 | <ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无。

参考文献

Guertin M. J., Martins A. L., Siepel A. and Lis J. T. Accurate prediction of inducible transcription factor binding intensities in vivo. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002610.

作者利用 PB-seq 证明了，在预测果蝇热休克因子 (HSF) 结合亲和性的变化时，H4 的 DNase I 超敏性和四乙酰化是最有影响力的协变量。他们创建了 HSF 结合序列的无偏好模型，揭示出 HSF/HSE 相互作用的不同生物物理学特性，并给出了以前未在 DNA 序列元件中识别出的结构。

Illumina 技术: Genome Analyzer II 系统

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

320. Guertin M. J., Martins A. L., Siepel A. and Lis J. T. Accurate prediction of inducible transcription factor binding intensities in vivo. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002610.

321. Ozer A., Pagano J. M. and Lis J. T. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e183.

SELEX 或 SELEX-seq：指数富集的配体系统进化技术 HT-SELEX：高通量配体指数富集的系统进化技术

自从 1990 年有 3 个独立团队首次对 SELEX 实验进行报道以来^{322,323,324}，该方法被广泛采用。^{325,326} 为 NGS 开发了高度多重化并行 HT-SELEX 方法。³²⁷

SELEX-seq 的变形方法³²⁸ 采用 Nextera 接头序列进行高效文库制备。³²⁹

在这种方法中，在 pD40htSELEX 表达载体中将蛋白质表达为与链霉亲和素结合多肽（SBP）融合的蛋白，并连接至 Gaussia 荧光素酶。每个 DNA 配体都含有 14 bp 的随机区域（14N），以及唯一地识别单个 SELEX 样本的 5 bp 条形码。部分巢式引物用于连续 SELEX 循环。将包含所有可能 14 bp 序列的双链 DNA 混合物与固定在 96 孔板的孔中的 DNA 结合蛋白一起孵育，使 DNA 结合到蛋白上。清洗和洗脱后，所得到的特异性更高的序列群通过 PCR 扩增，并进行测序。³²⁶



HT-SELEX 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 高通量、高效 提供软件流程^{330,331} | <ul style="list-style-type: none"> 可能具有序列偏差³³² |

综述

Anzalone A. V., Lin A. J., Zairis S., Rabadan R. and Cornish V. W. Reprogramming eukaryotic translation with ligand-responsive synthetic RNA switches. *Nat Methods*. 2016;13:453-458.

Jijakli K., Khraiweh B., Fu W., et al. The *in vitro* selection world. *Methods*. 2016;106:3-13.

322. Ellington A. D. and Szostak J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346:818-822.
323. Tuerk C. and Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249:505-510.
324. Sullenger B. A., Gallardo H. F., Ungers G. E. and Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell*. 1990;63:601-608.
325. Chen D., Orenstein Y., Golodnitsky R., et al. SELMAP - SELEX affinity landscape MAPping of transcription factor binding sites using integrated microfluidics. *Sci Rep*. 2016;6:33351.
326. Takahashi M., Wu X., Ho M., et al. High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency. *Sci Rep*. 2016;6:33697.
327. Jolma A., Kivioja T., Toivonen J., et al. Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. *Genome Res*. 2010;20:861-873.
328. Slattery M., Riley T., Liu P., et al. Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins. *Cell*. 2011;147:1270-1282.
329. Zhang Y., Lee J. K., Toso E. A., et al. DNA-binding sequence specificity of DUX4. *Skelet Muscle*. 2016;6:8.
330. Hoinka J. and Przytycka T. AptaPLEX - A dedicated, multithreaded demultiplexer for HT-SELEX data. *Methods*. 2016;106:82-85.
331. Caroli J., Taccioli C., De La Fuente A., Serafini P. and Bicciato S. APTANI: a computational tool to select aptamers through sequence-structure motif analysis of HT-SELEX data. *Bioinformatics*. 2016;32:161-164.
332. Takahashi M., Wu X., Ho M., et al. High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency. *Sci Rep*. 2016;6:33697.

参考文献

Urak K. T., Shore S., Rockey W. M., et al. In vitro RNA SELEX for the generation of chemically-optimized therapeutic RNA drugs. *Methods*. 2016;103:167-174.
本文描述了在体内应用中快速鉴定 RNA 适体的 SELEX 流程，其中包括利用原始的体外 SELEX 方法对经化学优化的 RNA 适体进行选择的具体实验方案。

illumina 技术：多种

Ahirwar R., Vellarikkal S. K., Sett A., et al. Aptamer-Assisted Detection of the Altered Expression of Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer. *PLoS One*. 2016;11:e0153001.

作者利用 HT-SELEX 鉴定 DNA 适体，该适体在人乳腺癌组织切片中选择性地结合雌激素受体 α (ER α) 从而促进其检出。他们验证了对乳腺癌患者组织样本中 ER α 的适体辅助组织化学分析的结果，并通过用 ER α 抗体对同样的样本进行免疫组化而进一步验证。研究结果显示，强阳性、中等阳性和阴性的乳腺癌组织中 ER α 的适体辅助检测表现出显著的一致性。

illumina 技术：HiSeq 2500 系统

Iaboni M., Fontanella R., Rienzo A., et al. Targeting Insulin Receptor with a Novel Internalizing Aptamer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e365.

作者利用基于细胞的 SELEX 方法，发现了具有核酸酶抗性的 RNA 适体，命名为 GL56，这种适体可以特异性识别胰岛素受体 (IR)。该适体快速内化到目标细胞中，能够将 IR 与高度同源的胰岛素样生长因子受体 1 区分开来。将该适体用于 IR 表达癌细胞时，它能抑制 IR 依赖性信号转导，说明它可以用作 IR 依赖性癌症的传递工具。

illumina 技术：MiSeq 系统

Long Y., Qin Z., Duan M., et al. Screening and identification of DNA aptamers toward Schistosoma japonicum eggs via SELEX. *Sci Rep*. 2016;6:24986.

Janowski R., Heinz G. A., Schlundt A., et al. Roquin recognizes a non-canonical hexaloop structure in the 3'-UTR of Ox40. *Nat Commun*. 2016;7:11032.

Schneider T., Hung L. H., Schreiner S., et al. CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci Rep*. 2016;6:31313.

Stewart H., Bingham R. J., White S. J., et al. Identification of novel RNA secondary structures within the hepatitis C virus genome reveals a cooperative involvement in genome packaging. *Sci Rep*. 2016;6:22952.

Oakes B. L., Xia D. F., Rowland E. F., et al. Multi-reporter selection for the design of active and more specific zinc-finger nucleases for genome editing. *Nat Commun*. 2016;7:10194.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

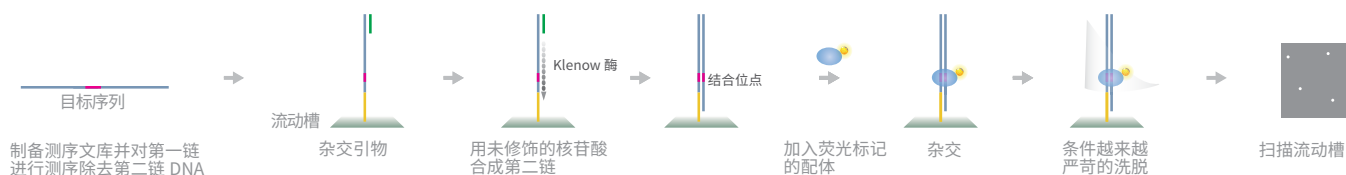
Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

HiTS-FLIP: 高通量测序结合荧光配体相互作用分析

HiTS-FLIP 是以前所未有的深度测量定量蛋白质-DNA 结合亲和力的技术。在这种方法中, 使用内置于高通量测序仪中的光学元件使蛋白质与流动槽中已测序 DNA 的体外结合可视化。³³³

对具有锚定单链 DNA 的微流体流动槽边合成边测序。第二链 DNA 被解离, 再利用 Klenow 聚合酶和未修饰的 dNTP 重建, 形成双链 DNA 簇。以不同浓度引入荧光标记的结合蛋白, 对结合进行成像。



HiTS-FLIP 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">定量、全面 | <ul style="list-style-type: none">需要专用设备学术界尚未广泛采用 |

综述

尚无。

参考文献

Nutiu R., Friedman R. C., Luo S., Khrebtukova I., Silva D., et al. Direct measurement of DNA affinity landscapes on a high-throughput sequencing instrument. *Nat Biotechnol.* 2011;29:659-664.

作者利用 HiTS-FLIP 研究酿酒酵母蛋白 GCN4, 该蛋白是酵母氨基酸饥饿反应的主要调节子。该研究得到大约 4.4 亿个结合测量数据, 从而确定了与 GCN4 具有亚微摩尔亲和力的全部 12-mer 序列的解离常数。

Illumina 技术: Genome Analyzer 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

333. Nutiu R., Friedman R. C., Luo S., et al. Direct measurement of DNA affinity landscapes on a high-throughput sequencing instrument. *Nat Biotechnol.* 2011;29:659-664.

DamID: DNA 腺嘌呤甲基转移酶相互作用检测

DamID 实现了在活细胞中鉴定蛋白质结合位点，而无需进行交联或免疫沉淀。在 2006 年，这种方法作为芯片方法被开发出来，然后应用于 NGS。³³⁴

DamID 涉及低水平表达的由 DNA 腺嘌呤甲基转移酶 (Dam) 和目标染色质蛋白组成的融合蛋白。该融合蛋白靶向染色质蛋白的天然结合位点，在此 Dam 使得周围 DNA 中的腺嘌呤甲基化。随后，分离甲基化的 DNA 片段，通过选择性 PCR 扩增并测序。³³⁵



DamID 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">可鉴定活细胞中的蛋白质结合位点，而无需进行交联或免疫沉淀提供有专用算法³³⁵ | <ul style="list-style-type: none">Dam 可能有毒性限于千碱基对大小的区域 |

综述

尚无。

参考文献

Pindyurin A. V., Pagie L., Kozhevnikova E. N., van Arensbergen J. and van Steensel B. Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:5646-5657.

作者利用基于蛋白质内含子的方法，通过在果蝇食物中加入配体来调节果蝇中 Dam 和 Dam 融合蛋白的表达水平。采用这种方法，他们在少量大脑组织样本中得到了 Polycomb 结合位点的神经胶质特异性谱图。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Mitchell A. C., Javidfar B., Bicks L. K., et al. Longitudinal assessment of neuronal 3D genomes in mouse prefrontal cortex. *Nat Commun.* 2016;7:12743.

作者引入了“神经元-Dam”，用于回顾性评价表观基因组状态。他们证明了，与小鼠前额叶皮层神经元的 Gad1 基因启动子相关联的 Dam 的短期表达得到 Gad1 结合染色体接触处的稳定 GMeATC 标签。NeuroDam 数据显示，对具有认知缺陷的小鼠的 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体进行药理封锁 4 个月后，小鼠在药物暴露后不久其染色体构象就已受到影响。

Illumina 技术：HiSeq 2000 系统

Perovanovic J., Dell'Orso S., Gnochci V. F., et al. Laminopathies disrupt epigenomic developmental programs and cell fate. *Sci Transl Med.* 2016;8:335ra358.

作者利用 DamID-seq 和与 Dam 融合的核纤层蛋白 A 突变形式，确定肌生成过程中核被膜处的常染色体-异染色质（表观）过渡。他们发现核纤层蛋白 A 错义突变以等位基因特异性的形式破坏了核纤层蛋白 A 相关的异染色质区的形成。

Illumina 技术：HiScan 系统

334. Vogel M. J., Guelen L., de Wit E., et al. Human heterochromatin proteins form large domains containing KRAB-ZNF genes. *Genome Res.* 2006;16:1493-1504.

335. Li R., Hempel L. U. and Jiang T. A non-parametric peak calling algorithm for DamID-Seq. *PLoS One.* 2015;10:e0117415.

McCann T. S., Guo Y., McDonald W. H. and Tansey W. P. Antagonistic roles for the ubiquitin ligase Asr1 and the ubiquitin-specific protease Ubp3 in subtelomeric gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:1309-1314.

Carl S. H. and Russell S. Common binding by redundant group B Sox proteins is evolutionarily conserved in *Drosophila*. *BMC Genomics*. 2015;16:292.

Kind J., Pagie L., de Vries S. S., et al. Genome-wide maps of nuclear lamina interactions in single human cells. *Cell*. 2015;163:134-147.

Klocko A. D., Rountree M. R., Grisafi P. L., et al. *Neurospora* importin alpha is required for normal heterochromatic formation and DNA methylation. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005083.

Steglich B., Stralfors A., Khorosjutina O., et al. The Fun30 chromatin remodeler Fft3 controls nuclear organization and chromatin structure of insulators and subtelomeres in fission yeast. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005101.

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

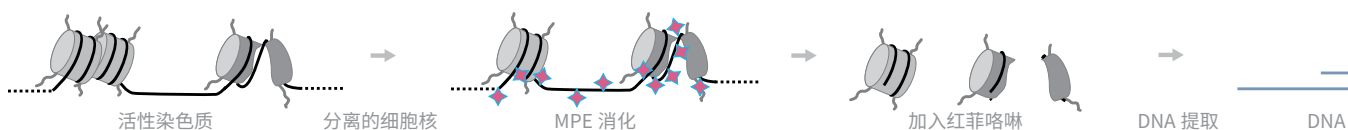
TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

MPE-seq: 甲铵丙基乙二胺四乙酸 (EDTA) 测序

MPE-seq 是在基因组水平对染色质进行鉴定的方法, 涉及用甲铵丙基-EDTA (MPE) 和二价铁的复合物处理细胞核。MPE-Fe (II) 复合物通过插入甲铵部分而与 DNA 结合, 然后在氧气存在的条件下发生单链和双链 DNA 断裂。

与 MNase 不同, MPE-Fe (II) 优先切除核小体之间的接头 DNA, 且几乎没有序列偏差。例如, RNA 剪接部位的 DNA 序列对 MNase 的消化超敏, 但对 MPE-Fe (II) 消化则不敏感。MPE-seq 和 MNase-Seq 的联合使用应当可以实现对非典型染色质结构的鉴定。



MPE-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">几乎没有序列偏差 | <ul style="list-style-type: none">未在其他实验室中重现 |

综述

尚无。

参考文献

Ishii H., Kadonaga J. T. and Ren B. MPE-seq, a new method for the genome-wide analysis of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E3457-3465.

作者用 MPE-Fe (II) 处理小鼠 ESC。为进行比较, 他们还同时用 MNase 消化了细胞核。用 MPE-seq 分析核小体定位, 发现了在 MNase-seq 分析中未发现的活性启动子区域峰值。作者还观察到 MPE-seq 可以利用某些转录因子检测序列特异性 DNA 结合。

Illumina 技术: HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

Nextera XT DNA Library Prep Kit

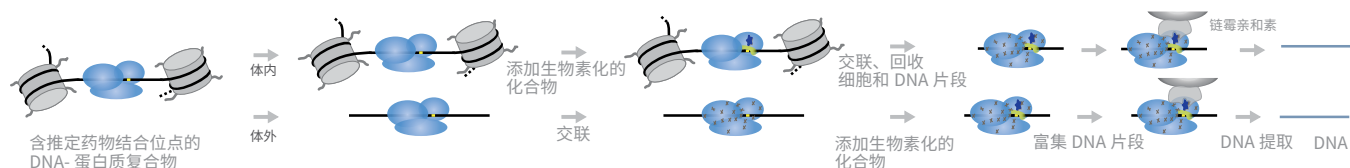
336. Hertzberg R. P. and Dervan P. B. Cleavage of double helical DNA by methidium-propyl-EDTA-iron(II). *Journal of the American Chemical Society.* 1982;104:313-315.

337. Ishii H., Kadonaga J. T. and Ren B. MPE-seq, a new method for the genome-wide analysis of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E3457-3465.

Chem-seq: 基于小分子化合物的位点结合识别测序

Chem-seq 可用于检测治疗性药物等小分子配体与基因组相关蛋白质的结合。这一信息可以为小分子药物对细胞功能的扰动提供重要的见解。³³⁸

Chem-seq 方法采用了 2 种途径。在活细胞中，加入生物素化药物，实现药物 - 靶标结合。使该复合体与甲醛交联，对细胞进行裂解和超声处理，然后用链霉亲和素微珠捕获该复合体。纯化富集的 DNA 片段并测序。对于体外分析，将生物素化药物加入到细胞提取物中，其余步骤与体内步骤一样。



Chem-seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 可用于活的人类细胞 | <ul style="list-style-type: none">• 生成的生物素衍生物可能会改变药物活性 |

综述

尚无。

参考文献

Anders L., Guenther M. G., Qi J., Fan Z. P., Marineau J. J., et al. Genome-wide localization of small molecules. *Nat Biotechnol.* 2014;32:92-96.

作者利用 Chem-seq 在 MM1.S 多发性骨髓瘤细胞中从基因组水平上研究溴结构域抑制剂 JQ1 与 BET 溴结构域家族成员 BRD2、BRD3 和 BRD4 的结合。他们合成了生物素化的 JQ1 衍生物，其在 MM1.S 细胞中的活性仅略微下降。体内和体外的 Chem-seq 都证明生物素化的 JQ1 所结合的基因组位点与 BRD2、BRD3 和 BRD4 所占位点高度相似。生物素化的 JQ1 的功能性失活对映异构体不会产生显著的 Chem-seq 信号。

illumina 技术：Genome Analyzer 系统

Jin C., Yang L., Xie M., et al. Chem-seq permits identification of genomic targets of drugs against androgen receptor regulation selected by functional phenotypic screens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:9235-9240.

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA Sample Preparation Kit

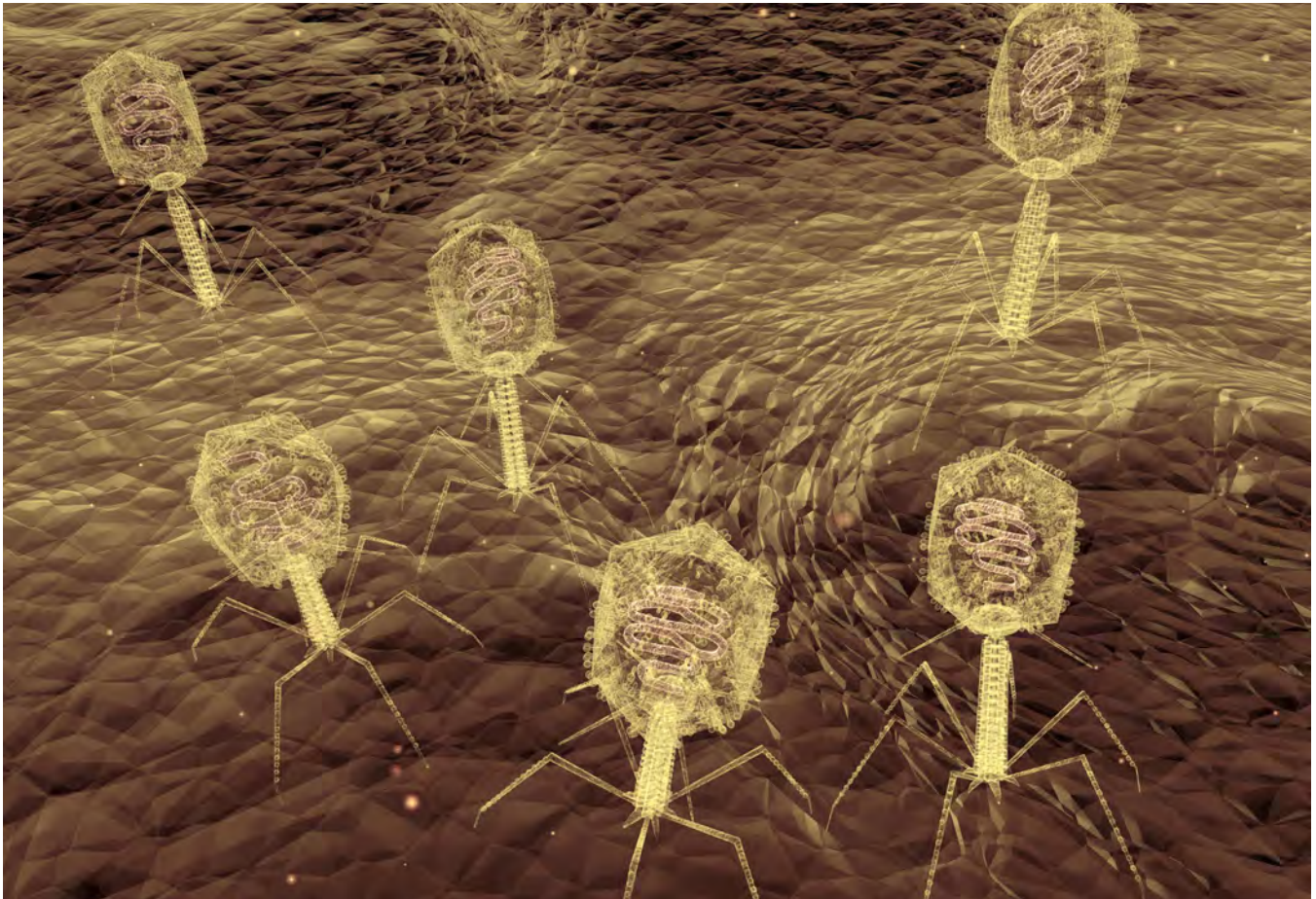
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

Nextera DNA Library Prep Kit

338. Anders L., Guenther M. G., Qi J., et al. Genome-wide localization of small molecules. *Nat Biotechnol.* 2014;32:92-96.

蛋白质 – 蛋白质相互作用

利用新一代测序研究蛋白质 – 蛋白质相互作用似乎是不可能的，但噬菌体展示重组蛋白却是一种完善的方法，可针对各种应用开发特异性亲和试剂。³³⁹ 高通量测序将全面地改变抗体和其他蛋白质结合分子的发现及工程化。数百万种可用的测序 read 提供了前所未有的取样深度，可指导设计和构建高效、高质量的天然文库，其中包含了上百亿种独特分子。³⁴⁰



噬菌体展示技术广泛用于蛋白质 – 蛋白质相互作用的高通量筛选。编码目标蛋白质的基因被插入噬菌体中，由噬菌体展示。展示的蛋白质根据目标蛋白质进行筛选，以检查结合。

综述

Cariccio V. L., Domina M., Benfatto S., et al. Phage display revisited: Epitope mapping of a monoclonal antibody directed against *Neisseria meningitidis* adhesin A using the PROFILER technology. *MAbs*. 2016;8:741-750.

Jijakli K., Khraiwesh B., Fu W., Luo L., Alzahmi A., et al. The *in vitro* selection world. *Methods*. 2016;106:3-13.

Glanville J., D'Angelo S., Khan T. A., Reddy S. T., Naranjo L., et al. Deep sequencing in library selection projects: what insight does it bring? *Curr Opin Struct Biol*. 2015;33:146-160.

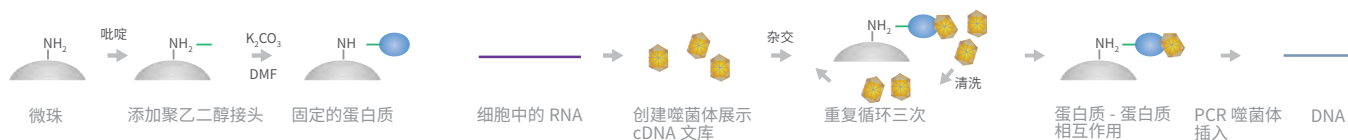
339. Bradbury A. R., Sidhu S., Dubel S. and McCafferty J. Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. *Nat Biotechnol*. 2011;29:245-254.

340. Glanville J., D'Angelo S., Khan T. A., et al. Deep sequencing in library selection projects: what insight does it bring? *Curr Opin Struct Biol*. 2015;33:146-160.

PD-Seq: 候选细胞靶蛋白鉴定

PD-Seq 是通过蛋白质 - 蛋白质相互作用来鉴定蛋白质的细胞靶标的实验方案。³⁴¹

在这种方法中, 研究人员可识别芹菜黄素的细胞靶标。在用 4- 硝基苯酚溴乙酯激活后, 他们将芹菜黄素偶联到氨基聚乙二醇 - 聚丙烯酰胺共聚物 (PEGA) 微珠上。利用加载芹菜黄素的微珠筛选使用人乳腺癌肿瘤细胞 mRNA 生成的噬菌体 cDNA 文库。3 轮后, 将这部分用于制备文库, 并在 Illumina 平台测序。



PD-Seq 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 可以检测大量细胞靶标 | <ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用 |

综述

Arango D., Morohashi K., Yilmaz A., Kuramochi K., Parihar A., et al. Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:E2153-2162.

参考文献

尚无。

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

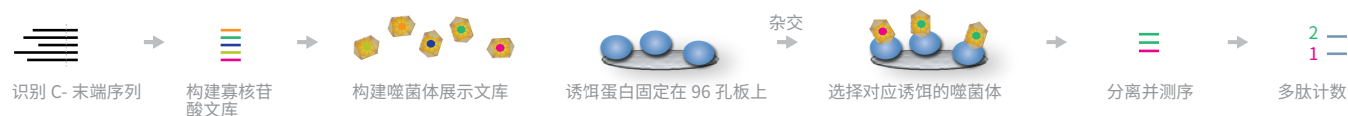
341. Arango D., Morohashi K., Yilmaz A., et al. Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:E2153-2162.

ProP-PD: 蛋白组多肽 - 噬菌体展示技术

PDZ-Seq: PDZ 域测序

ProP-PD 是鉴定短线性基序 (SLiM) 相互作用或 PDZ 域 (PDZ-Seq) 的实验方案。^{342,343} ProP-PD 可用于直接鉴定具有潜在生物学意义的配体。³⁴⁴ 这种方法与常用的组合噬菌体展示技术不同, 后者使用高度多样化的文库来确定优选的结合基序。

在这种方法中, 首先鉴定出 C 端序列, 创建寡核苷酸文库。然后, 构建噬菌体展示文库, 与固定的诱饵蛋白杂交。多轮选择后, 对所选的结合到 PDZ 域的池进行测序和计数。深度测序提供了与特异性蛋白质相互作用的相关序列的详细信息。



ProP-PD 示意图。

| 优点 | 缺点 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">直接鉴定配体 | <ul style="list-style-type: none">寡核苷酸库的构建可能出现偏差 |

综述

尚无。

参考文献

Garrido-Urbani S., Garg P., Ghossoub R., et al. Proteomic peptide phage display uncovers novel interactions of the PDZ1-2 supramodule of syntenin. *FEBS Lett.* 2016;590:3-12.

作者使用展示人类蛋白组 C 端区域的文库, 通过 ProP-PD 分析同线蛋白 (syntenin) PDZ1-2。该蛋白质可识别大量多肽, 偏好疏水性基序和内隐配体。

illumina 技术: 未指定 illumina 系统

Ivarsson Y., Arnold R., McLaughlin M., Nim S., Joshi R., et al. Large-scale interaction profiling of PDZ domains through proteomic peptide-phage display using human and viral phage peptidomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:2542-2547.

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

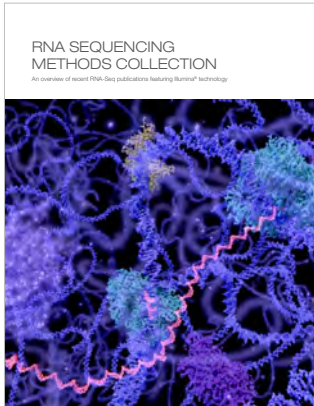
TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

342. Ivarsson Y., Arnold R., McLaughlin M., et al. Large-scale interaction profiling of PDZ domains through proteomic peptide-phage display using human and viral phage peptidomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:2542-2547.

343. Ernst A., Gfeller D., Kan Z., et al. Coevolution of PDZ domain-ligand interactions analyzed by high-throughput phage display and deep sequencing. *Mol Biosyst.* 2010;6:1782-1790.

344. Sundell G. N. and Ivarsson Y. Interaction analysis through proteomic phage display. *Biomed Res Int.* 2014;2014:176172.

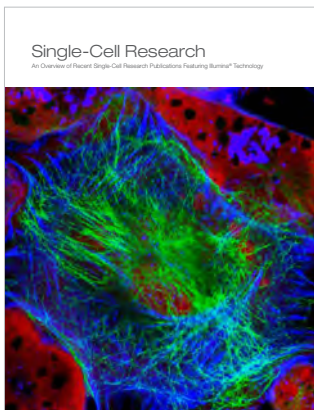
更多科学文献综述，请访问 www.illumina.com/pubreviews



RNA 测序方法合集

本出版物是针对 RNA 测序的新一代测序（NGS）方法合集，汇编自科学文献。谨以此合集向使用人员的创新及该技术方法的多功能性致敬。我们希望它能够启发研究人员对这些方法加以利用或开发新方法，以解决新的科研难题。

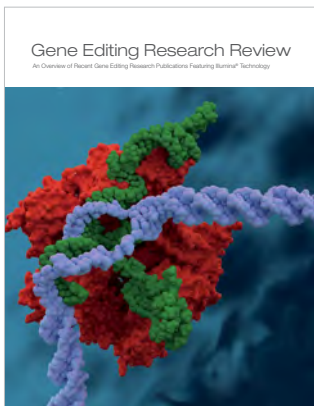
本合集所称的方法指的是提取核酸（样本制备）与添加测序所需寡核苷酸接头（文库制备）之间的处理步骤。该技术仅需额外增加若干处理步骤，即可解决多种科研问题。



单细胞研究综述

单细胞组织测序的主要动力来自癌症研究，其中细胞谱系和残留疾病的检测是我们最关心的问题。我们正利用相同的方法，来改善我们对高度复杂的生物学系统的了解，比如神经发育和免疫学。

这篇文档着重突出了最近发表的一些文献，它们证明了 Illumina 技术在单细胞测序以及极低起始量的应用和技术中的使用。



基因编辑研究综述

CRISPR-Cas9 是最新开发的基因组编辑技术，研究人员可以通过该技术方便快捷地执行准确的基因操作。该技术应用范围很广。与其他分子生物学技术一样，研究的关键是获得高度特异性的结果。这篇综述重点展示了最近发表的一些文献，介绍了将基因组技术和高通量测序用于 CRISPR-Cas9 实验，以检验特异性和全基因组的脱靶效应相关研究。

本科学文献综述由 Illumina 公司出品。

Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279
北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855
技术支持热线 400-066-5835 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn
仅供研究使用。不得用于诊断。

© 2017 Illumina, Inc. 保留所有权利。Pub. No. 373-2017-001



@illumina_china



@illumina

illumina®