

illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

使用因美纳基因测序仪实现灵
活、经济、准确的长读长测序

- 靶向长读长与短读长相结合，获得互补、深入的人类基因组解析
- 利用可扩展、稳健的文库制备技术，使用低 DNA 起始量即可获得可靠的结果
- 仅需两天的文库制备工作流程，兼容自动化，且无需专用设备

illumina®

简介

借助成熟的因美纳边合成边测序（SBS）化学技术与屡获殊荣的 DRAGEN™ 二级分析，研究人员可以得到准确度极高的全基因组测序（WGS）数据^{1,2}。尽管如此，仍存在一小部分基因组区域（包括高度同源或重复区域），仅靠短读长难以绘制。针对这些棘手的区域，长读长测序可以为标准短读长 WGS 数据提供补充。同时使用高准确度短读长和长读长有助于提高分辨率并绘制以往难以绘制的区域。

在这之前，由于长读长测序对 DNA 质量和起始量都有严苛的要求，因此兼容的样本类型也颇为有限³⁻⁶。如今，Illumina Complete Long Reads 技术可让基因组学实验室在同一测序仪上同时进行短读长和互补长读长测序，并采用单一分析流程。这种高性能检测使用标准的因美纳新一代测序（NGS）工作流程生成连续的长读长序列，DNA 起始量仅需 10 ng，无需专门的提取、剪切或片段长度筛选（图 1）。

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 为靶向长读长测序提供了一种经济高效、灵活的解决方案。高效的富集文库制备只需两天，支持自动化且易于扩展，适合高通量研究。

靶向长读长可用于处理标准短读长测序中已知绘制率较低的区域。另外，靶向长读长也可用于整个基因或区域，以实现长达数百 kb 的定相测序，从而解析单倍型。Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 可用于扩展现有的 WGS 数据集，或作为反馈检测工具更广泛地检测变异。

通过 NovaSeq™ 平台实现靶向、高质量的长读长测序

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 已通过 NovaSeq X Plus、NovaSeq X、NovaSeq 6000 和 NovaSeq 6000Dx（RUO 模式）基因测序仪的验证。该检测方法灵活，针对不同质量的样本可提供一致的结果，同时与其他长读长测序解决方案相比，所需的 DNA 起始量减少了 90%。因美纳建议的 DNA 起始量为 50 ng，但仅需 10 ng 也能获得可靠的结果。Illumina Complete Long Reads 技术对常见的抑制因子和污染物有很强的耐性，血液、唾液或组织中的 DNA 可得到很好的结果^{7,8}。与其他长读长解决方案相比，此项技术能从更多类型的样本中获得全面的见解。

Illumina Complete Long Reads 结合了因美纳专有的文库制备分析、成熟的因美纳 SBS 化学技术和强大的 DRAGEN 二级分析，可生成高度准确的长读长数据（图 2）。单分子 DNA 长片

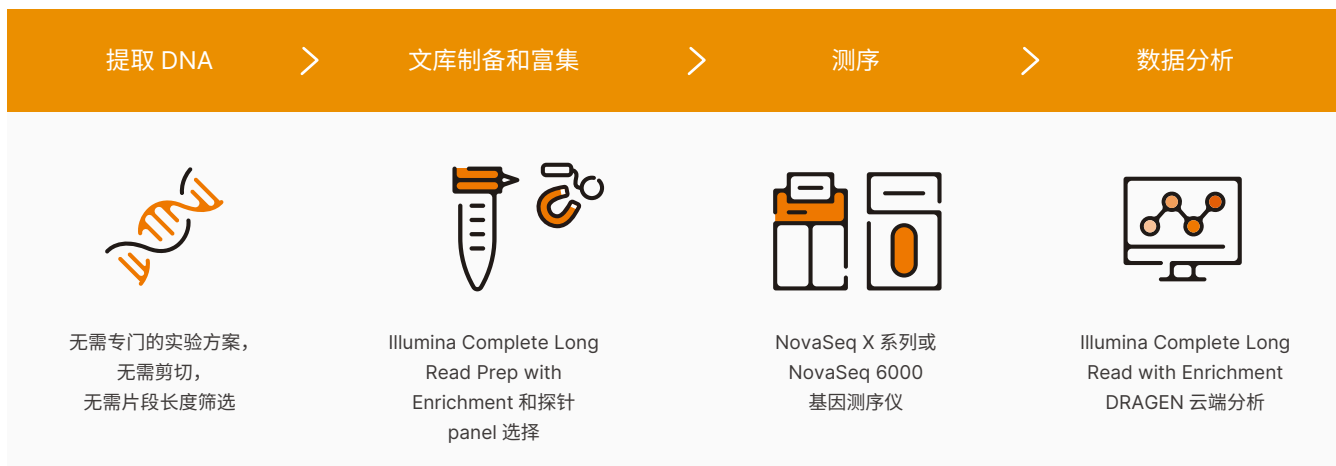


图 1: Illumina Complete Long Reads with Enrichment 工作流程——使用可扩展、经过优化的文库制备方案、成熟的因美纳测序化学技术和 DRAGEN 二级分析，经济高效地获取靶向长读长 WGS 数据。需要来自同一样本的 $\geq 30\times$ 标准短读长 WGS 数据用于分析。可以使用之前运行的样本中的 FASTQ 文件。

段以独特的模式被标记（或称为“界标”），然后扩增、富集并进行测序。杂交捕获富集步骤与靶向探针 panel 让测序专注于最能从长读长信息中受益的区域。界标能够区分重复或难以绘制的区域，生成 N50 为 5-7 kb 的长读长⁷。长读长数据与未标记的标准 WGS 文库相结合，生成连续的长读长，可完整、准确地展示靶向的原始单分子片段。

长读长，为你所用

研究人员可以在高准确度短读长 WGS 数据上分层地靶向长读长，从而将测序经费集中于复杂的基因组区域。得益于靶向长读长的高度灵活性，用户可选择多个预先设计的 panel，或使用 Illumina DesignStudio™ 软件定制 panel，该软件是一款免费、用户友好的实验分析设计工具（表 1，表 2）。选择能满足您研究需求的富集探针 panel：既可增加低覆盖度区域的覆盖度，也可对基因组区域进行定向。

Illumina Human Comprehensive Panel

大型 Illumina Human Comprehensive Panel 针对受益于长读长的一小部分基因区域，靶向超过 6,500 个蛋白质编码基因的低覆盖度点位⁹。在开发该 panel 的过程中，因美纳评估了 20,000 多个蛋白质编码基因，以靶向低绘制区域。其中排除了仅通过短读长就能全面覆盖的基因。Human Comprehensive Panel 提高了目标区域的覆盖度和变异检出能力（图 3A）。该 panel 经过优化，可与 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 一起使用，并预先生成，或作为预设 panel 在 DesignStudio 工具中进一步定制化。

使用 DesignStudio 软件预先设计的 panel

研究人员如果需要以更低的成本实现更高的通量，可以选择聚焦 panel 进行长读长富集（表 1）。DesignStudio 软件中提供了几种预先设计的 panel，也可进一步定制（表 2）。

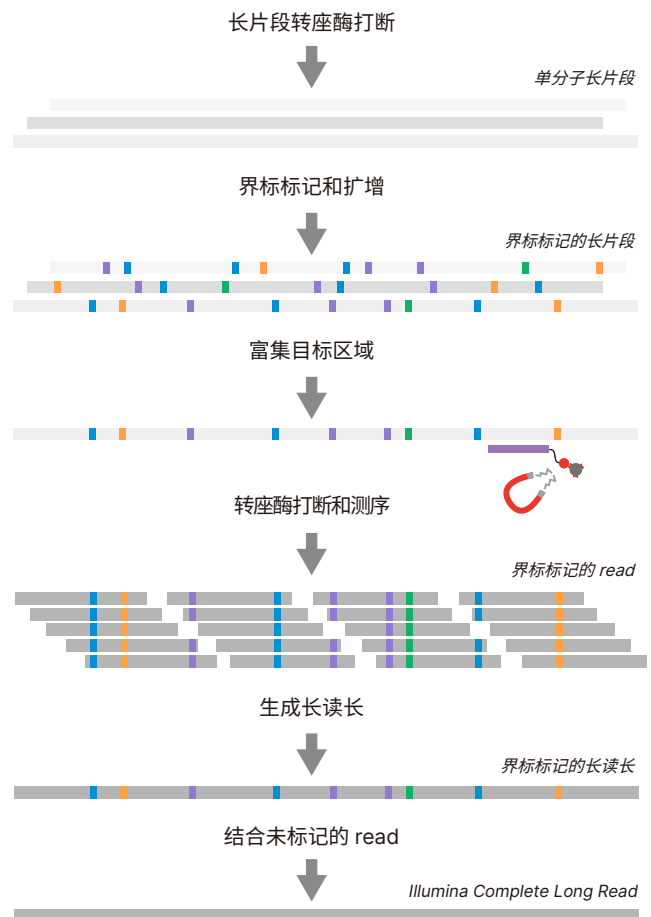


图 2：Illumina Complete Long Reads 的工作原理——该检测使用转座酶片段化生成 DNA 长片段 (> 10 kb)，无需剪切或片段长度筛选。在单分子水平上对长片段进行“界标标记”，以捕获和保存片段内的长读长信息（无需复杂的条形码或接头）。使用杂交捕获探针 panel 来富集目标区域的界标标记长片段。然后将富集的长片段再次标记，从而得到可直接用于测序的文库。分析将生成 read，并将数据与未标记的标准 WGS 库（来自同一样本，单独测序）相结合，生成高度准确的 Illumina Complete Long Reads。

表 1: Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 产生 30× 最终覆盖度的建议样本通量^{a,b,c}

	Illumina Human Comprehensive Panel	大型 panel	中型 panel	小型 panel		
目标区域大小 ^d	> 95 Mb	约 20 Mb	约 10 Mb	约 5 Mb		
每个样本的建议数据量 ^a	90–120 Gb	30–60 Gb	15–30 Gb	7.5–15 Gb		
300 循环试剂盒	每个流动槽的样本数量 ^e				每个流动槽的产出	运行时间
NovaSeq 6000 SP 试剂	2	8	16	32	约 250 Gb	约 25 小时
NovaSeq 6000 S1 试剂	4	16	32	66	约 500 Gb	约 25 小时
NovaSeq 6000 S2 试剂	10	40	82	166	约 1.25 Tb	约 36 小时
NovaSeq 6000 S4 试剂	24	100	200	400f	约 3 Tb	约 44 小时
NovaSeq X 系列 1.5B 试剂	4	16	32	66	约 500 Gb	约 21 小时
NovaSeq X 系列 10B 试剂	24	100	200	400f	约 3 Tb	约 25 小时
NovaSeq X 系列 25B 试剂	64	266	532f	1066f	约 8 Tb	约 48 小时

a. 需要 2×150 bp 测序运行和每 Mb 目标区域的 5M–10M 双端 read (约 1.5–3 Gb 数据)，从而产生约 30× 的 Illumina Complete Long Reads 最终覆盖度。每个样本的定制 panel 数据要求只是一个建议的起点。用户可根据 panel 性能优化分配的数据。

b. 需要来自同一样本的 ≥ 30× 标准短读人类全基因组数据用于分析。推荐使用 Illumina DNA PCR-Free Prep。也兼容第三方 WGS 试剂盒。未标记的文库无需同时制备或测序，可以使用之前运行的样本中的 FASTQ 文件。

c. 在 NovaSeq 平台上对 Illumina Complete Long Reads 文库执行测序有可能导致运行报告的 Q30 分值低于 NovaSeq 性能指标。这既不表示测序运行有性能问题，也不表示文库有问题。

d. 目标区域大小为填补探针位置长度的总和，在重叠处合并。

e. 根据每 Mb 目标区域 5M 双端 read (1.5 Gb 数据) 计算的样本通量示例。

f. 最多可用 384 个唯一双标签序列。对于 NovaSeq X 系列，独立通道上样可实现更多样本的多重分析。在 NovaSeq 6000 基因测序仪上使用 NovaSeq 6000 Xp 工作流程进行独立通道上样。

这些 panel 靶向许多不同的区域，包括复杂区域医学相关基因 (CMRG)¹⁰、药物遗传学 (PGx) 试验检测通常靶向的基因^{11–13}、美国医学遗传学和基因组学学会 (ACMG) 二级研究结果列表 (ACMG SF v3.1) 基因¹⁴，或整个主要组织相容性复合体 (MHC) 区域¹⁵。

定制 panel

用户可以根据自身需求创建一个独特的 panel，重点关注感兴趣的部分基因。DesignStudio 工具支持定制 panel 设计，其算法针对长片段富集进行了调整。第三方寡核苷酸 panel 也与 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 兼容。

可扩展、高通量的工作流程

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 工作流程易于实现自动化，只需标准实验室设备，并且具有高度可扩展性，可支持更多样本的全面 WGS (图 1)。文库制备方案简单，第一天大约需要 6.5 小时 (手动操作时间约为 3 小时)，然后进行过夜杂交反应，第二天大约需要 5.5 小时 (手动操作时间约为 3 小时)。

使用 NovaSeq X 系列 10B 或 25B 流动槽，可为大型队列提供更高的通量，并降低大型 panel 的成本 (表 1)。使用 NovaSeq X Plus 基因测序仪，用户每年可生成多达 15,000 个增强的和高准确度基因组。将 NovaSeq X 系列 1.5B 流动槽等低通量耗材用于小型 panel，可降低分批处理要求。

表 2：专为 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 设计的杂交捕获探针 panel

Panel	目标基因或区域	Panel 规格
Illumina Human Comprehensive Panel ^a	超过 6,500 个蛋白质编码基因的低覆盖度点位 ⁹	> 95 Mb
CMRG panel ^b	391 个医学相关基因，已知这些基因难以用短读长解析 ¹⁰	22.5 Mb
PGx panel ^b	药物遗传学试验检测中常见的 98 个靶向基因 ¹¹⁻¹³	8.1 Mb
ACMG panel ^b	来自 ACMG 二级研究结果列表（ACMG SF v3.1）的 78 个独特基因 ¹⁴	7 Mb
MHC panel ^b	GRCh38.p14 组装中的整个 MHC 区域（超过 140 个基因） ¹⁵	4.9 Mb

a. 预制的优化 panel。
b. DesignStudio 软件中提供的预先设计和定制 panel。CMRG，复杂区域医学相关基因；PGx，药物遗传学；ACMG，美国医学遗传学和基因组学学会；MHC，主要组织相容性复合体。

一体化、全面分析

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 的数据分析可在 BaseSpace™ Sequence Hub App 中进行或通过 Illumina Connected analytics 进行。单一 DRAGEN 流程可分析短读长和长读长，提供全面的 WGS 结果。结果合并为一套输出文件，其中包括 DRAGEN 靶向检出程序¹⁶。

利用靶向长读长数据实现高度准确的 WGS

与单独的标准短读长 WGS 相比，Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 数据在复杂目标区域的覆盖度和准确性都有所提高（图 3，图 4）。靶向 Illumina Complete Long Reads 还能成功解析完整基因的单倍型，并能对 MHC 等高多态性区域的大区块定相（图 5）。

总结

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 提供了一种灵活、高性价比的解决方案，进一步完善了成熟的因美纳 WGS，并专注于能提供更大价值的长读长。Illumina Complete Long Reads 支持在同一台仪器上进行长读长和短读长测序并采用单一 DRAGEN 分析流程，助力基因组学实验室轻松实现全面的 WGS。相似的一体化工作流程为用户提供了更具扩展性和准确性的全基因组检测。

了解更多

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

[Human Comprehensive Panel](#)

[长读长测序技术](#)

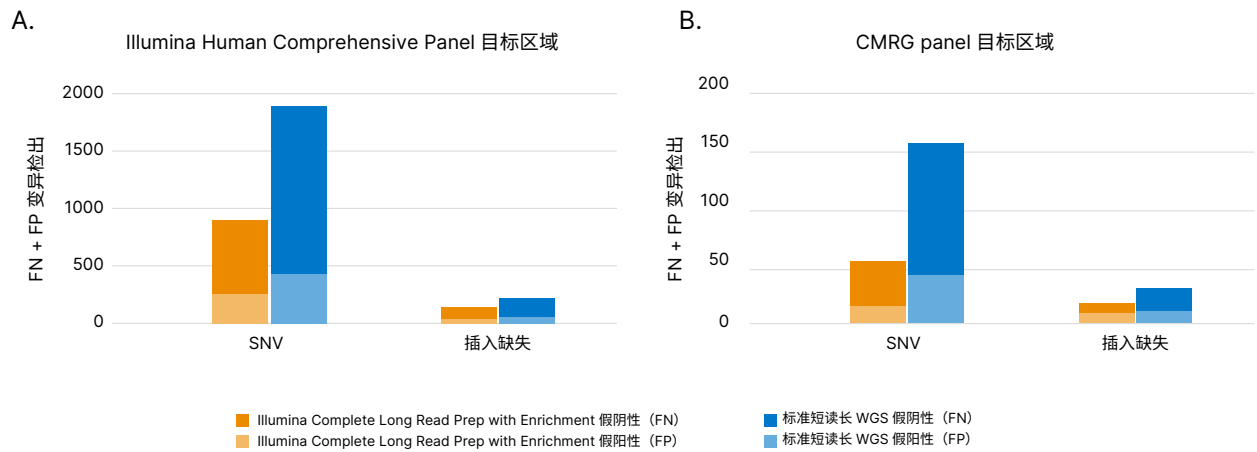


图 3：通过靶向长读长提高复杂区域的变异检出准确性——与标准短读长 WGS（蓝色）相比，使用 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment（橙色）在 (A) Illumina Human Comprehensive Panel 或 (B) CMRG Panel 靶向的 HG002 基因区域的 SNV 和插入缺失的假阴性（FN）和假阳性（FP）变异检出情况。

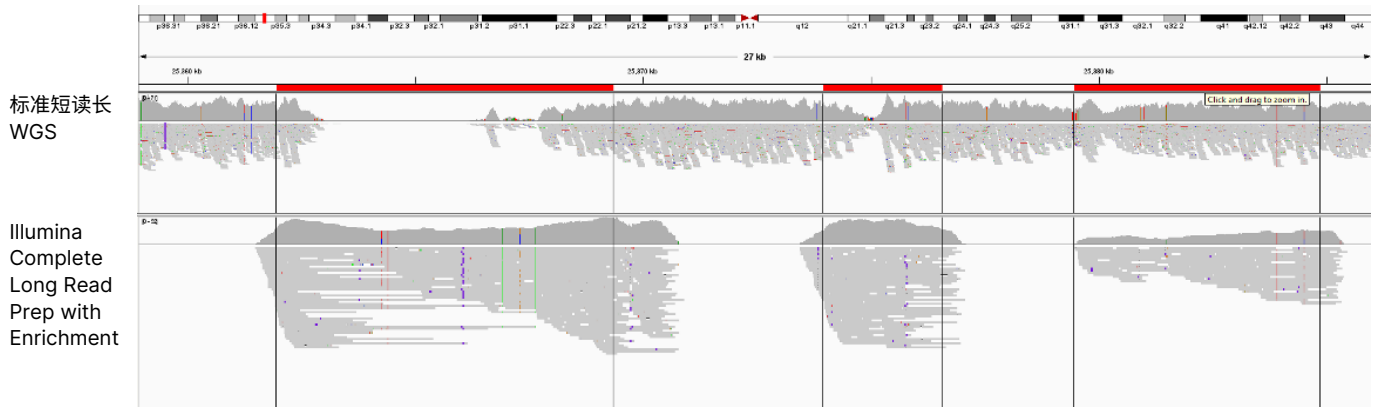
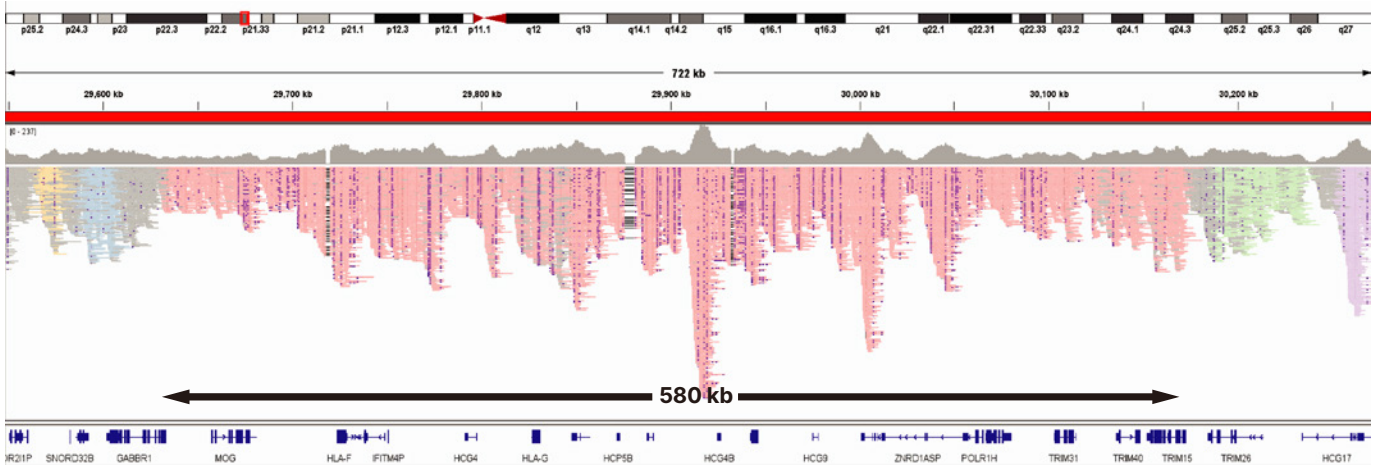


图 4：对复杂区域实现经济高效的人类全基因组覆盖——Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 有助于增加对复杂基因区域（如 *RHCE* 基因中的区域）的覆盖度，以补充标准短读长人类 WGS。Integrative Genomics Viewer (IGV) 中使用标准短读长 WGS（上）和 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment（下）测序的 *RHCE* 图谱。目标区域用红色标注。

A.



B.

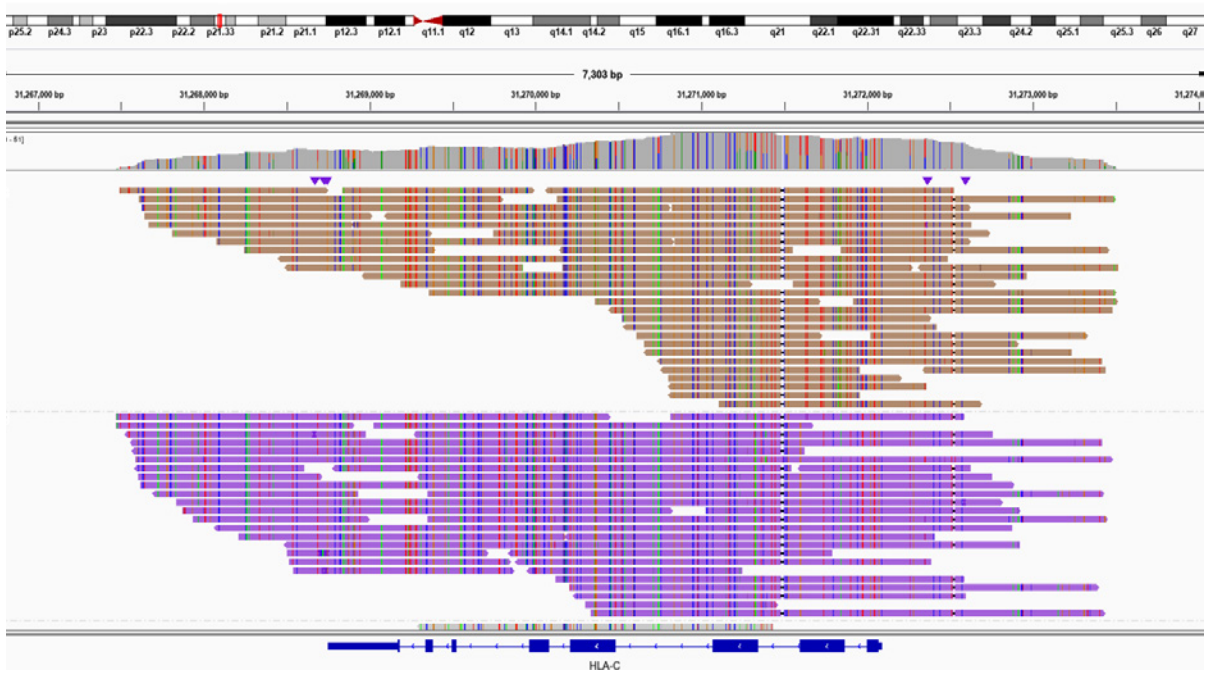


图 5：靶向长读长有助于解析多态性基因中的单倍型——使用 Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human 进行长读长测序的 IGV 图谱。(A) MHC 基因位点 722 kb 区域的定相。一个相区块中包含 580 kb 的区域（粉红色）。(B) *HLA-C* 基因完全定相。Reads 按单倍型区分。

参考文献

- Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN Wins at Precision-FDA Truth Challenge V2 Showcase Accuracy Gains from Alt-aware Mapping and Graph Reference Genomes. [illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html). Published 2020. Accessed January 12, 2023.
- Illumina. Accuracy improvements in germline small variant calling with the DRAGEN Bio-IT Platform. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf). Published 2022. Accessed February 1, 2023.
- Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifisequencing-extraction-and-quality-control/](https://www.pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifisequencing-extraction-and-quality-control/). Published 2022. Accessed January 12, 2023.
- Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. [pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genomeand-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genomeand-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf). Published 2022. Accessed October 5, 2023.
- Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. <https://store.nanoporetech.com/us/productdetail/?id=ligationsequencing-kit-v14>. Accessed October 5, 2023.
- Pacific Biosciences. Low Yield troubleshooting Guide. [pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-troubleshooting.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-troubleshooting.pdf). Published 2018. Accessed January 12, 2023.
- Illumina. Illumina Complete Long Read prep, human data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-datasheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-mgl-01420.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-datasheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-mgl-01420.pdf). Published 2022. Accessed September 22, 2023.
- Illumina. Comprehensive whole-genome sequencing with Illumina Complete Long Read prep, human technical note. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-technote-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-technote-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf). Published 2022. Accessed September 22, 2023.
- Bekritsky Ma, Colombo C, Eberle MA. Identifying genomic regions with high quality single nucleotide variant calling. [illumina.com/science/genomics-research/articles/identifyinggenomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/identifyinggenomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html). Published 2021. Accessed August 30, 2023.
- Wagner J, Olson ND, Harris L, et al. Curated variation benchmarks for challenging medically relevant autosomal genes. *Nat Biotechnol.* 2022;40(5):672-680. doi:10.1038/s41587-021-01158-1
- PharmGKB. VIPs: Very Important Pharmacogenes. [pharmgkb.org/vips](https://www.pharmgkb.org/vips). Accessed September 22, 2023.
- National Library of Medicine. GTR: Genetic Testing Registry. Precision HealthpGx Panel (25 Genes). [ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/). Updated November 29, 2022. Accessed September 22, 2023.
- Pratt VM, Everts RE, Aggarwal P, et al. Characterization of 137 Genomic DNA Reference Materials for 28 Pharmacogenetic Genes: A GeT-RM Collaborative project. *J Mol Diagn.* 2016;18(1):109-123. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.08.005
- Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2022;24(7):1407-1414. doi:10.1016/j.gim.2022.04.006
- Kulski JK, Suzuki S, Shiina T. Human leukocyte antigen superlocus: nexus of genomic supergenes, SNPs, indels, transcripts, and haplotypes. *Hum Genome Var.* 2022;9(1):49. doi:10.1038/s41439-022-00226-5
- Roessler K. Illumina Complete Long Reads software analysis workflow for human WGS. [illumina.com/science/genomicsresearch/articles/complete-long-read-software-analysis.html](https://www.illumina.com/science/genomicsresearch/articles/complete-long-read-software-analysis.html). Published 2023. Accessed September 22, 2023.

订购信息

产品	货号
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (24 样本)	20113832
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (96 样本)	20113833
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (24 样本)	20113834
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (96 样本)	20113835
Illumina Human Comprehensive Panel (24 样本)	20113836
Illumina Human Comprehensive Panel (96 样本)	20113837
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (32 μ L, 120 bp)	20073953
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (384 μ L, 120 bp)	20073952
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (1536 μ L, 120 bp)	20111339

订购信息

产品	货号
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 标签, 48 样本)	20098166
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 标签, 96 样本)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 标签, 96 样本)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 标签, 96 样本)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 标签, 96 样本)	20091660
Illumina Analytics - 1 iCredit	20042038

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) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
 市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2024 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
 关于具体的商标信息, 请访问 www.illumina.com.cn/company/legal.html。
 M-GL-02188 v1.0



illumina[®]