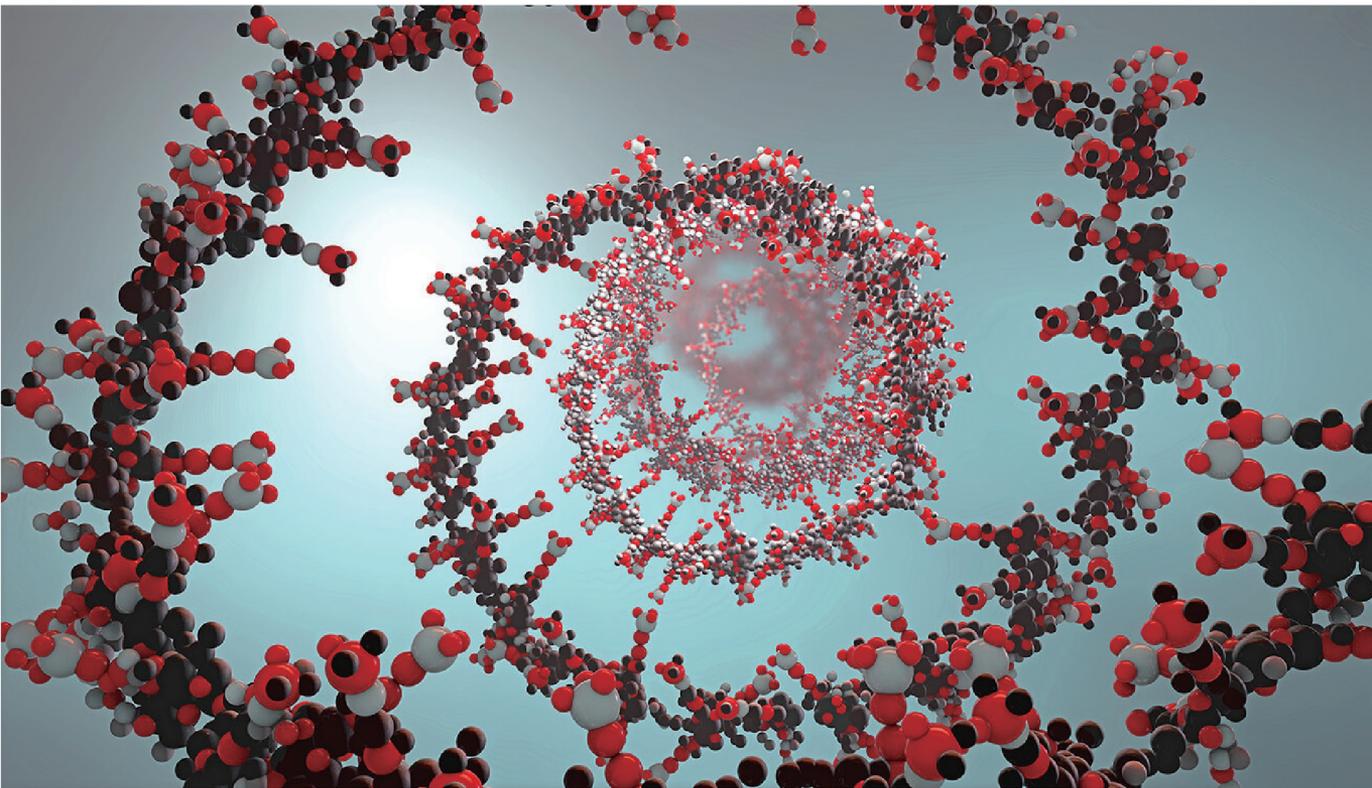


人类医学研究服务目录

Service Catalog of Human Medical Research



上海天昊生物科技有限公司，2008年4月创建于上海浦东张江高科技园区。作为上海高新技术企业，天昊生物研发了多项具有国际水平的专利技术，包括多种SNP分型和拷贝数检测技术、微生物16S扩增子绝对定量技术，在2018年荣获“浦东新区企业研发机构”称号。公司总经理姜正文博士获得江苏省“双创人才”、苏州工业园区“领军人才”等荣誉，并于2019年荣获“上海市青年科技杰出贡献奖”。



天昊生物拥有1250平米标准化的实验室，建立并完善了包括 ABI 3130xl、ABI 3730xl测序仪、实时定量PCR仪、Illumina GAIIX、Illumina Miseq、Illumina NextSeq二代测序平台和细胞生物学分析平台在内的多个分子生物学分析研究平台。从接收样品到实验操作都按严格的SOP运行，于2018年5月通过ISO: 9001:2015质量管理体系认证。

天昊生物拥有一支长期从事基因及遗传分析的专业团队，其中公司总经理姜正文博士毕业于复旦大学遗传学专业，在美国辛辛那提大学获得环境基因组学博士学位。市场部售前专家团队全部具有国内知名院校医学或遗传学博士学历；研发部硕士及以上学历占77%。



天昊生物在人类医学遗传和动植物、微生物领域已经形成了涉及分子生物学、基因组学和遗传学相关科研服务体系超过100类，迄今已经为国内外近1200多家科研院校、医疗单位和生物公司提供了超过16000多项科研技术服务。

天昊生物秉承自主创新的理念，独立研发了包括拷贝数检测、SNP分型和目的区域富集测序以及微生物16S扩增子绝对定量测序在内的多种具有国际水平的专利技术。截至目前，公司递交了4项PCT专利，35项国内发明专利，已注册54件商标。

目录 CONTENTS

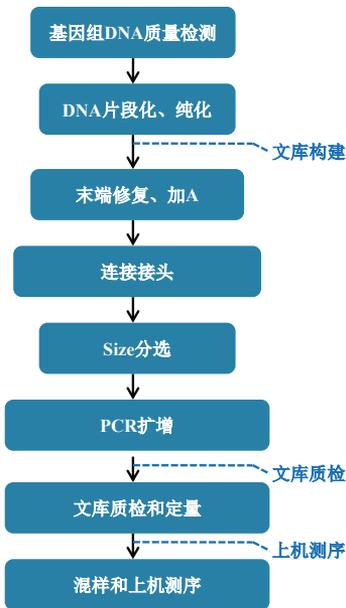


	医学基因组测序
— 03	全基因组测序
— 05	全外显子组测序
— 07	肿瘤全外显子组测序
— 09	目的区域测序
	医学转录组测序
— 12	10x Genomics 单细胞转录组测序
— 16	全转录组测序
— 18	mRNA 测序
— 20	miRNA 测序
— 22	lncRNA 测序
— 24	circRNA 测序
— 26	微量 mRNA 测序
— 28	血浆、外泌体类样本 miRNA 测序
— 30	RNA 相对表达量 qPCR 检测
	医学表观组检测
— 32	开放性染色质测序 (ATAC-seq)
— 34	全基因组甲基化测序
— 36	Illumina 850k 甲基化芯片检测
— 38	MethylTarget® 多重目的区域甲基化富集测序
— 41	m6A 甲基化修饰总体水平定量
— 42	m6A RNA 甲基化测序 (MeRIP-seq)
	医学微生物测序
— 44	宏基因组测序
— 47	细菌 16S/ 真菌 18S/ITS 扩增子测序
— 50	微生物功能基因扩增子测序
— 52	微生物 16S 扩增子绝对定量测序
	天昊专利—基因组变异检测
— 54	SNP 分型
— 64	CNV 分型

全基因组测序

人类全基因组测序（Whole Genome Sequencing, WGS）是利用高通量测序平台对人类不同个体或群体进行全基因组测序，并在个体或群体水平上进行生物信息分析。WGS可全面挖掘DNA水平的遗传变异，为筛选疾病的致病及易感基因，研究疾病遗传机制、人类进化和人类群体遗传学等提供重要信息。

技术路线



技术优势

- ◆ **与SNP芯片相比**：可挖掘新的稀有变异；
- ◆ **与外显子和目的区域测序相比**：WGS可检测多种变异信息，尤其在检测大的结构变异（大区域CNV，倒置，易位）中有明显优势；同时可以检测到非编码区变异；
- ◆ **技术本身优势**：不存在捕获富集，有效数据覆盖度均一；可检测到病毒整合基因组区域；实验流程更简单，实验周期较短。

技术参数

全基因组测序	
样本要求	a. 样本类型：完整无污染的基因组DNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 50 ng/ μ L c. 样本纯度：OD _{260/280} 介于 1.8-2.0，OD _{260/230} ≥ 2.0 d. 样本需求量：总量 ≥ 2 μ g
测序平台	Illumina HiSeq X Ten: 2 \times 150bp
测序深度	遗传疾病：建议 30 \times 肿瘤：癌组织建议 100 \times ，癌旁组织建议 100 \times

➔ 数据分析内容

基本分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 原始数据整理、质量评估 序列过滤、统计富集效率 参考基因组比对与注释统计 SNV/InDel/CNV/SV 检测, 注释, 统计
高级分析内容	
单基因病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析 基于家系连锁分析 纯合区域策略分析
复杂疾病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 常见变异的关联分析 罕见变异的基因负荷检验 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析
肿瘤分析内容	<ul style="list-style-type: none"> Somatic SNV/InDel/CNV/SV 检测, 注释, 统计 不同阶段样本突变谱差异统计 高频突变基因统计 驱动基因统计分析
天昊特色分析内容	天昊二代测序数据验证试剂盒完成 96 个 SNP 分型, 分析与二代测序结果的一致性

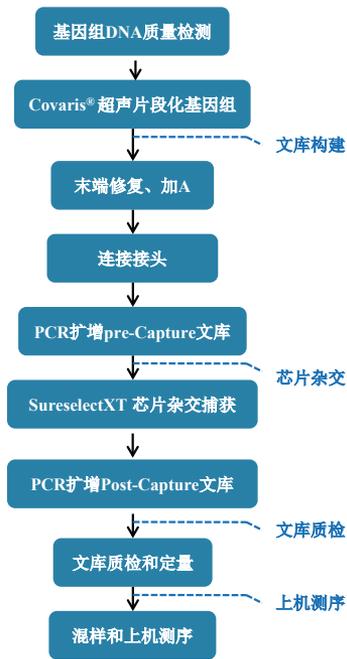
➔ 合作客户高分文章

文章	研究方向	合作单位
Intronic pentanucleotide TTTCA repeat insertion in the SAMD12 gene causes familial cortical myoclonic tremor with epilepsy type 1, Brain, 2018, IF:10.84.	家族性疾病致病基因分析	浙大医学院附属第二医院: 天昊基因科技 (苏州)

全外显子组测序

全外显子组是基因组全部外显子区域的总和，对于人类来说，外显子组约占基因组的 1%。全外显子组测序（Whole Exome Sequencing, WES）结合外显子组富集技术和二代测序技术，可以高效快速的获得待测样品基因组所有已知基因的外显子及其邻近区域的序列及变异。相比于全基因组测序，全外显子组测序更加经济、高效，数据解读也更加简单。

技术路线



技术优势

- ◆ **更加直接：** 外显子及邻近区域是基因功能和调控最直接的体现！
- ◆ **更加经济：** 以往 20 个基因外显子传统测序经费就可以成就您的全外显子组梦想！
- ◆ **更加高效：** 快速完成传统测序方法无法想象的实验任务！
- ◆ **天昊独家：** 每个样品免费提供“天昊二代测序数据验证试剂盒”验证结果，该试剂盒包含 96 个位于人类基因外显子组中的中国人群高频 SNP 位点，用于验证二代测序基本数据的可靠性。

技术参数

全外显子组测序	
样本要求	a. 样本类型：完整无污染的基因组 DNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 20 ng/ μ L c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0, OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本需求量：总量 ≥ 2 μ g
捕获平台	Agilent SureSelect Human All Exon V6（捕获区域 58M）
测序平台	Illumina Hiseq 2000: 2 \times 150bp
测序数据质量	单个样本 10G 数据量；Q30 > 80%（可依据疾病类型调整）

➔ 数据分析内容

基本分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 原始数据整理、质量评估 序列过滤、统计富集效率 参考基因组比对与注释统计 SNV/InDel/CNV 检测, 注释, 统计
高级分析内容	
单基因病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析 基于家系连锁分析 纯合区域策略分析
复杂疾病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 常见变异的关联分析 罕见变异的基因负荷检验 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析
肿瘤分析内容	<ul style="list-style-type: none"> Somatic SNV/InDel/CNV/SV 检测, 注释, 统计 不同阶段样本突变谱差异统计 高频突变基因统计 驱动基因统计分析
天昊特色分析内容	天昊二代测序数据验证试剂盒完成 96 个 SNP 分型, 分析与二代测序结果的一致性

➔ 天昊客户部分已发表文章

文章	研究方向	合作单位
Stop-gain mutations in UBAP1 cause pure autosomal-dominant spastic paraplegia, Brain, 2019	痉挛性截瘫	福建医科大学附属第一医院等
RINT1 Bi-allelic Variations Cause Infantile-Onset Recurrent Acute Liver Failure and Skeletal Abnormalities, The American Journal of Human Genetics, 2019	急性肝功能衰竭; 骨骼畸形	复旦大学附属儿科医院等
Defects in MYO5B are associated with a spectrum of previously undiagnosed low γ -glutamyltransferase cholestasis, Hepatology, 2017	胆汁淤积症	复旦大学附属儿科医院
Biallelic Mutations in CFAP43 and CFAP44 Cause Male Infertility with Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella, The American Journal of Human Genetics, 2017	生殖系统疾病	复旦大学附属妇产科医院等
GUCA1A mutation causes maculopathy in a five-generation family with a wide spectrum of severity, Genetics in Medicine, 2017	眼科	复旦大学附属眼耳鼻喉科医院

肿瘤全外显子组测序

肿瘤因体细胞突变（Somatic Mutation）积累引起，相较于常规样本中生殖突变（Germline Mutation）位点的检测，肿瘤样本因为纯度低、异质性高、质量差等原因，需要更高的测序深度，更优化的数据分析方法才能更有效、更精确地鉴定其中的突变位点。

全外显子组测序（Whole Exome Sequencing, WES），作为大规模组学研究的常备技术，是一种利用杂交技术将全基因组外显子区域 DNA 捕获富集后进行高通量测序，从而鉴定与蛋白质结构、功能变异相关突变的技术手段。相较于全基因组测序（Whole Genome Sequencing, WGS），全外显子组测序更加经济、高效，在相同测序成本条件下，可以高深度地检测更多的实验样品，更为精准地鉴定常见变异以及罕见变异，高效地发现全新突变。

天昊生物使用全自动核酸抽提工作站，确保样本抽提的稳定性，最大程度避免样本间污染。使用业内最优的 Covaris 超声基因组片段化方案，结合精心优化的文库构建体系进行 DNA 文库构建，最大程度地保证文库转化效率，在满足高深度测序的同时，尽可能减少珍贵实验样本的消耗。金标准的 SureSelect Human All Exon V6 芯片，捕获效率优，目标区域覆盖均匀度高，多重保障确保肿瘤样本体细胞突变检出的灵敏度和特异性。

➡ 技术优势

- ◆ **金标准：**使用业界公认的 SureSelect Human All Exon V6 芯片。
- ◆ **一代验证：**使用 SNPscan 技术确保样本突变检出的准确性。
- ◆ **高性价比：**相较全基因组测序，相同测序量可高深度地检测更多实验样品。

➔ 技术参数

肿瘤全外显子组测序	
样本要求	<p>实体瘤 & 对照样本（血细胞、口腔上皮、癌旁）</p> <p>a. 样品需求量：Qubit 检测，要求浓度 ≥ 20 ng/μL；总量 ≥ 1.5 μg b. 样品纯度：无色透明，OD260/280 = 1.7~1.9；OD260/230 ≥ 2.0 c. 样品完整度：琼脂糖电泳检测，要求主条带清晰，无明显弥散及拖尾，且无 RNA 污染 d. 样品保存和运输要求：-20°C 保存，冰袋运输</p> <p>FFPE</p> <p>a. 样品需求量：Qubit 检测，要求浓度 ≥ 20 ng/μL；总量 ≥ 1 μg b. 样品纯度：无色透明，OD260/280 = 1.7~1.9；OD260/230 ≥ 2.0 c. 样品完整度：琼脂糖电泳检测，要求 SMEAR 条带 > 500bp，且无 RNA 污染 d. 样品保存和运输要求：-20°C 保存，冰袋运输</p> <p>血浆</p> <p>a. 样品需求量：Qubit 检测，要求浓度 ≥ 0.5 ng/μL；总量 ≥ 50 ng b. 样品纯度：无色透明 c. 样品完整度：Agilent2100 检测，主峰位于约 160bp，无大片段污染 d. 样品保存和运输要求：-20°C 保存，干冰运输</p>
测序平台	Illumina 2 \times 150bp
测序数据质量	<p>实体瘤 & 对照样本（血细胞、口腔上皮、癌旁）</p> <p>12G/25G/50G 原始测序量；目标区域测序深度 100\times/200\times/500\times；测序深度达到 20\times/40\times/100\times 的碱基比例 $> 90\%$</p> <p>FFPE</p> <p>15G/30G/60G 原始测序量；目标区域测序深度 100\times/200\times/500\times；测序深度达到 15\times/30\times/60\times 的碱基比例 $> 80\%$</p> <p>血浆</p> <p>12G/25G/50G 原始测序量；目标区域测序深度 100\times/200\times/500\times；测序深度达到 20\times/40\times/100\times 的碱基比例 $> 80\%$</p>

➔ 数据分析内容

标准分析	<ul style="list-style-type: none"> • 测序数据汇总及数据质量评估 • 比对到参考基因组及注释统计 • SNV/InDel 检测 • SNV/InDel 注释及分类统计 • SNV/InDel 位点过滤及优先级分类 • 96 位点 SNPscan[®] 验证
高级分析	<ul style="list-style-type: none"> • CNV/SV 检测与注释（非石蜡样本） • 候选致病基因功能富集分析 • Somatic 突变频谱分析 • Somatic 高频突变、通路分析 • Somatic 驱动基因预测 • 肿瘤纯度及倍型分析
个性化信息挖掘	<ul style="list-style-type: none"> • 常见变异的关联分析 • 常见疾病罕见位点关联分析

目的区域测序

目的区域测序（Target Sequencing）是指针对感兴趣的目标区域富集后进行大规模测序。研究者可以针对自己感兴趣的染色体区域或者大量的候选基因区域进行数百个甚至上千个样品的序列测定。目前，天昊生物主要提供两种目的区域富集方法：定制液相芯片富集和 FastTarget™ 多重目的区域富集。

◆ 定制液相芯片富集测序技术

该富集方法利用商业 Agilent SureSelect 液相芯片富集捕获系统，定制目的区域的相关捕获探针，通过探针与样品片段化 DNA 的杂交和富集，将捕获之后洗涤获得的目的区域片段进行文库构建，扩增后利用 Illumina Hiseq 高通量二代测序系统进行 PE150 的测序，对所获得测序数据进行生物信息学的读取、质控及分析，研究感兴趣的序列及序列差异。该方法非常适合 100kb-12Mb 区域的多个候选基因外显子或连续区域富集二代测序项目。

◆ FastTarget™ 多重目的区域富集测序技术

FastTarget™ 技术针对目的区域设计多重 PCR 扩增体系，对研究者感兴趣的基因组区域进行捕获富集。一个扩增反应体系可以完成 16-20 个 PCR 反应，直接获得 4kb 左右的基因组区域。该技术方法非常成熟，方法快速、操作简单，无需复杂的建库过程。后续，利用 Illumina Hiseq 测序仪的 2×150bp 测序模式对目的片段实现双向测序，对所获得测序数据进行生物信息学的读取、质控及分析，研究感兴趣的序列及序列差异。该方法非常适合 < 200kb 的多个候选基因外显子富集二代测序项目。

⇒ 技术优势

- ◆ **针对性强：**比起全基因组及全外显子组水平的研究，目的区域测序更具有针对性，可以依赖大量的前期研究成果，获得候选染色体区域或者基于生物通路的大量候选基因。
- ◆ **费用低：**目的待测区域较小，可对数百个样品进行快速测序，大大降低了研究成本。
- ◆ **信息量大：**比起目的区域或者候选基因单倍型标签 SNP 分型的研究策略，目的区域测序可以完整覆盖整个基因区域，不仅可以获得高频 SNP 的分型数据，而且还可以发现低频的和个体特有的变异。
- ◆ **效率高：**比起使用 Sanger 法的候选基因测序方法，基于二代测序技术的目的区域测序更加快速、高效。
- ◆ **高精度：**目的区域的高测序深度保证了更准确的测序结果。

⇒ 技术路线



⇒ 技术参数

富集方法	样本要求	测序策略	数据要求
定制液相芯片富集	a. 样本类型：完整无污染的基因组 DNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 20 ng/ μ L c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0， OD260/230 ≥ 2.0 d. 样品需求量：总量 > 2 μ g	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina 2\times150bp 	<ul style="list-style-type: none"> • 对于通过质控所有样本，提供测序原始数据，样本的下机原始数据总测序深度平均达到 200\times，碱基 Q30 比例 $> 80\%$；90% 以上的样本目标区域平均测序深度 $> 50\times$，且这些样本测序深度达到 10\times 的碱基比例 $> 90\%$。以上数据标准不适用于位于或包含高 GC 区域。
FastTarget™ 富集	a. 样本类型：完整无污染的基因组 DNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 20 ng/ μ L； c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0， OD260/230 ≥ 2.0 d. 样品需求量：30 ng/Panel	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina 2\times150bp 	<ul style="list-style-type: none"> • 对于通过质控所有样本，平均目标区域测序深度 $> 500\times$，碱基 Q30 比例 $> 75\%$；超过 90% 的样本目标区域测序深度 $> 300\times$，这些样本大于 20\times 的片段比例平均大于 90%；以上数据标准不适用于位于或包含高 GC 区域、STR 区域的扩增子。

➔ 数据分析

基本分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 原始数据整理、质量评估 序列过滤、统计富集效率 比对到目的区域 SNV/InDel/CNV 检测, 注释, 统计
高级分析内容	
单基因病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析 基于家系连锁分析 纯合区域策略分析
复杂疾病分析内容	<ul style="list-style-type: none"> 突变位点过滤 (数据库过滤, 匹配正常样本过滤) 依据家系信息进行遗传模式分析 常见变异的关联分析 罕见变异的基因负荷检验 候选致病基因功能注释 候选致病基因通路富集分析
肿瘤分析内容	<ul style="list-style-type: none"> Somatic SNV/InDel/CNV/SV 检测, 注释, 统计 不同阶段样本突变谱差异统计 高频突变基因统计 驱动基因统计分析
天昊特色分析内容	天昊二代测序数据验证试剂盒完成 96 个 SNP 分型, 分析与二代测序结果的一致性

➔ 合作客户文章集锦

文章	研究方向	合作单位
A novel homozygous FBXO43 mutation associated with male infertility and teratozoospermia in a consanguineous Chinese family, Fertility and Sterility, 2019	男性不育	兰州大学
An ERCC4 regulatory variant predicts grade - 3 or - 4 toxicities in patients with advanced non - small cell lung cancer treated by platinum - based therapy, International Journal of Cancer, 2018, IF: 7.36.	肺癌; 治疗; 基因变异	复旦大学附属肿瘤医院
Novel idiopathic DCM-related SCN5A variants localised in DI-S4 predispose electrical disorders by reducing peak sodium current density, Journal of Medical Genetics, 2017, IF:5.571.	心脏疾病; 基因变异	复旦大学附属中山医院
Familial Hypercholesterolemia Phenotype in Chinese Patients Undergoing Coronary Angiography, Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2017, IF: 6.086.	心血管领域; 散发样本	阜外医院
Genomic variations of the mevalonate pathway in prokeratosis, Elife, 2015, IF:7.616.	皮肤病; 代谢通路; 致病基因	复旦大学附属华山医院; 天昊基因科技 (苏州)
Whole-exome and targeted sequencing identify ROBO1 and ROBO2 mutations as progression-related drivers in myelodysplastic syndromes, Nature communications, 2015, IF:12.353	骨髓增生; 肿瘤; 散发样本; 致病基因	上海市第六人民医院

10x Genomics 单细胞转录组测序

单细胞转录组研究极大地提高了我们对于组织、器官和生物体复杂性的认知，单个细胞中的基因表达特征显示了细胞类型和亚群的空前的多样性，而传统的转录组技术方法无法揭示这些重要信息。

10x Genomics 单细胞转录组测序是基于油包水液滴进行单细胞分离，并针对单个细胞内的 mRNA 进行扩增和高通量测序的一项新技术。单细胞表达谱的绘制能够完美地揭示细胞间基因表达的异质性，并解释异质性和对研究的生物学问题的贡献度；能够从复杂生物样本中发现表征稀有细胞类型；能够在无参考靶标的情况下发现新的靶点、标志物、细胞类型和状态；能够在成千上万个细胞中同时进行高通量和高分辨率的功能基因的筛选。10x Genomics 单细胞转录组测序适用于绝大部分细胞类型，并且已被广泛应用于肿瘤、遗传健康、免疫、生殖发育、神经、非肿瘤复杂疾病、植物、微生物等众多方向。

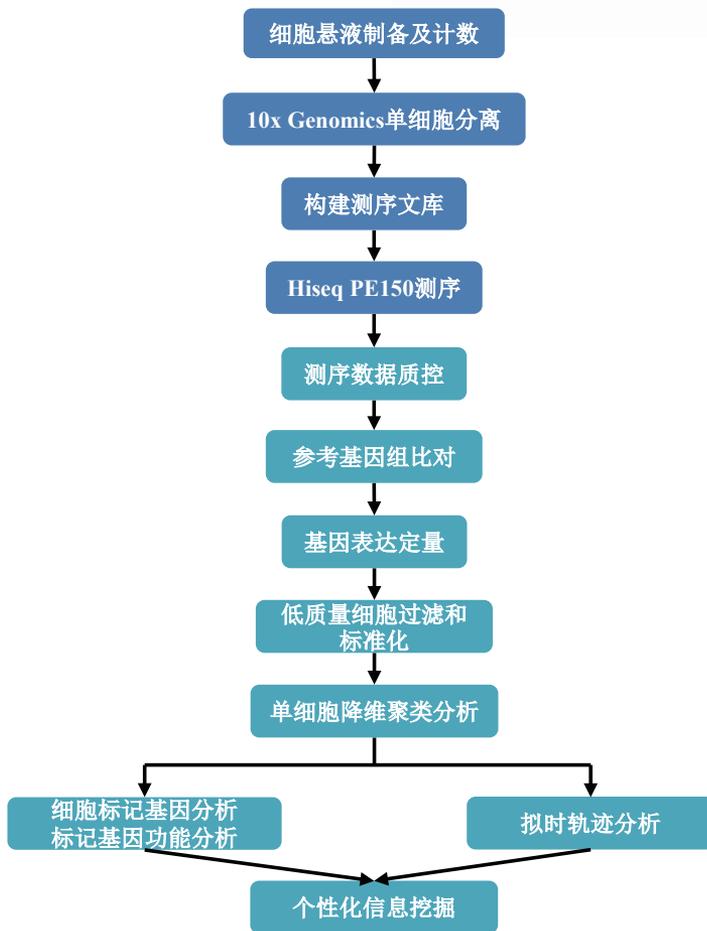
➡ 技术优势

- ◆ 高通量单细胞分析方法中具有最高的灵敏度、准确性和一致性
- ◆ 能够实现快速分选，一次可对 1000-10000 个细胞进行建库
- ◆ 具有极高的灵敏度，细胞捕获效率高达 65%
- ◆ 实验流程简单，细胞大小选择更灵活
- ◆ 双细胞比例仅为 0.9%/1000 个细胞
- ◆ 同时适用于单核转录组测序

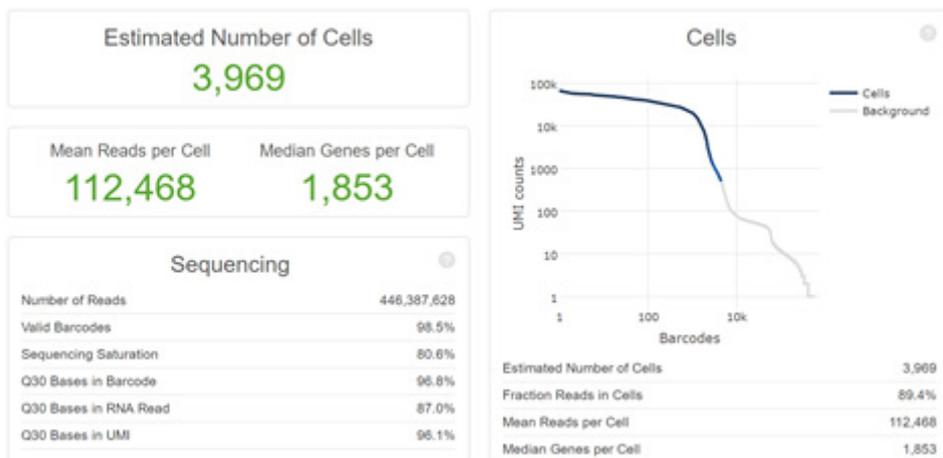
➡ 技术参数

样本要求	测序策略	数据要求
a. 细胞分离：由合作方完成细胞悬液制备（公司可协助），公司上门进行单细胞文库构建 b. 样品类型：单细胞悬液，不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} c. 样本状态：细胞直径 $< 40 \mu\text{m}$ ，细胞活性 $> 90\%$ d. 样本需求量：细胞数目 $\geq 1 \times 10^5$ cells/sample；细胞浓度 $5 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^6$ cells/ml	• 10x Genomics 3' 基因表达文库	• Illumina 2x150bp；默认 50k raw reads /cell

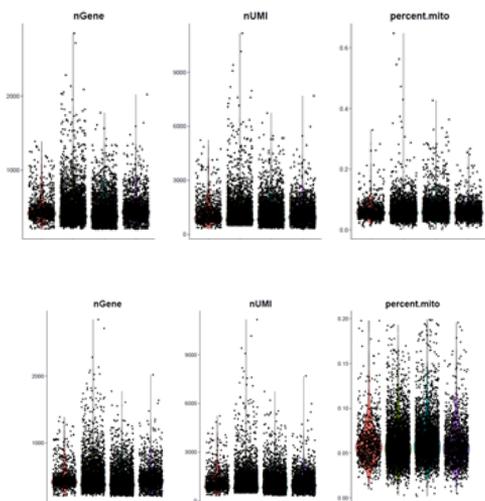
⇒ 技术路线



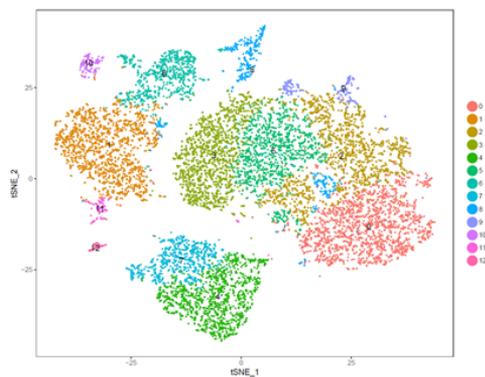
➔ 结果展示



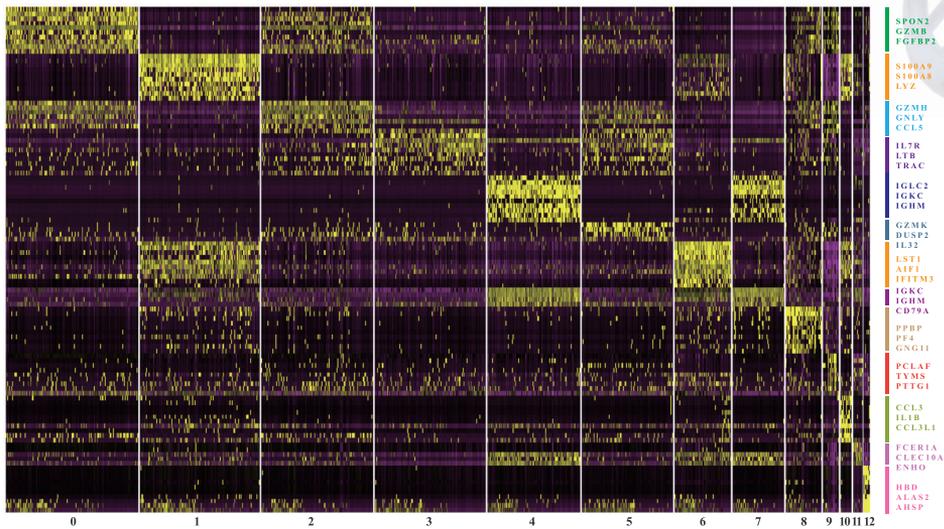
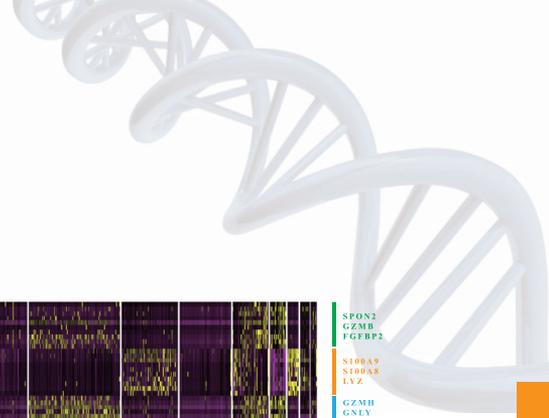
测序数据及细胞质控统计结果



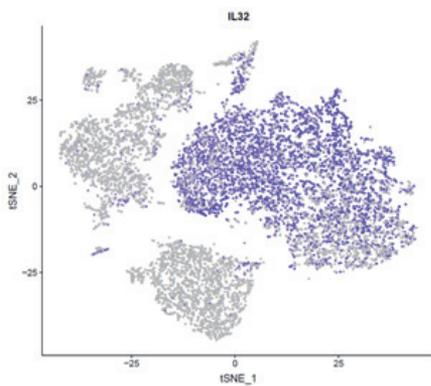
质控前（上图）和质控后（下图）细胞表达量统计结果



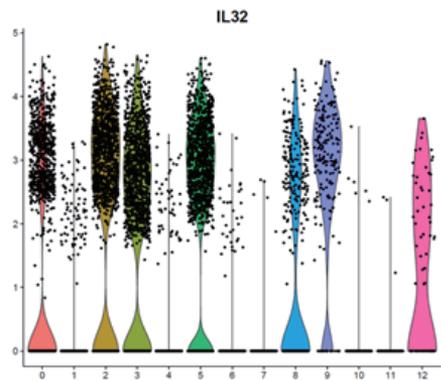
tSNE 聚类图



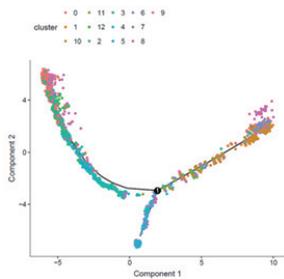
细胞cluster特异表达基因热图，取其中3个基因展示



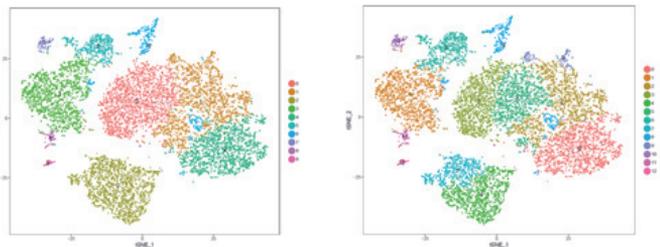
标记基因在聚类中高表达分布图



标记基因在聚类中表达量小提琴分布图



拟时轨迹分析图



不同分辨率下的 tSNE 聚类图展示

全转录组测序

全转录组 (Whole Transcriptome) 是指特定物种、组织或细胞类型在某个时期或条件处理下, 能转录出来的所有转录本的总和, 包括 mRNA 和非编码 RNA (ncRNA)。目前所说的全转录组测序, 主要检测了 mRNA 和三种 ncRNA, 即 lncRNA、circRNA 和 miRNA。

技术路线

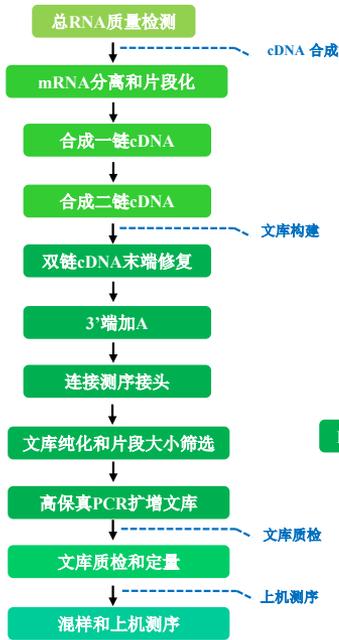


图1 rRNA 去除的链特异性文库

技术优势

- ◆ rRNA 去除建库, 保留了完整的 RNA 种类信息;
- ◆ 链特异性文库, 可以保留转录本的链信息, 更准确地检测反义 RNA;
- ◆ 使用高通量测序, 能够获得更加全面的 RNA 信息, 包括低丰度的 RNA;
- ◆ 通过测定的序列信息精确地分析不同类型 RNA 的表达丰度变化及其生物学功能;
- ◆ 整合分析同一样本中的多种类型 RNA, 明确这些 RNA 之间的共表达和调控关系。

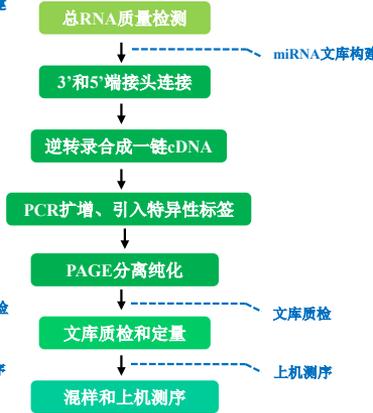
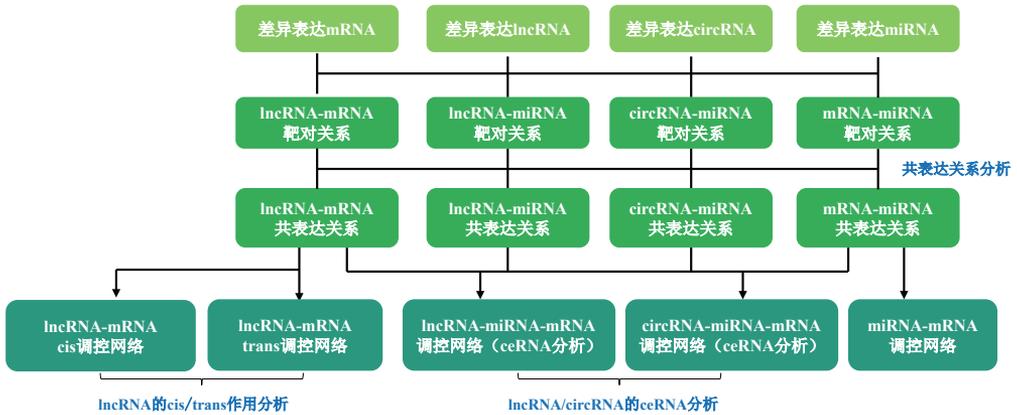
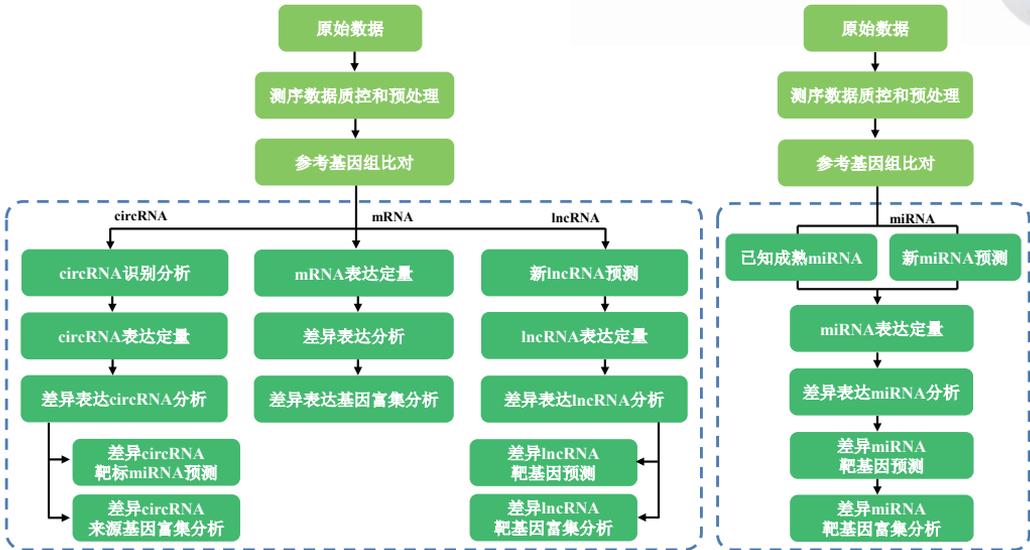


图2 小 RNA 文库

技术参数

样本要求	测序策略	数据要求
a. 样本类型: 完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度: 浓度 ≥ 200 ng/ μ L c. 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.2, OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本总量: 总量 ≥ 4 μ g e. 样本完整度: 28S/18S ≥ 1.0 , Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0	• Total RNA-seq: rRNA 去除链特异性文库, Illumina 2 \times 150bp; • miRNA-seq: small RNA 文库, Illumina 2 \times 150bp	• Total RNA-seq, Q30 > 80%, 数据量 ≥ 12 G/ 样本, rRNA 比例低于 raw data 的 5%; • miRNA-seq, Q30 > 80%, 数据量 ≥ 10 M reads/ 样本

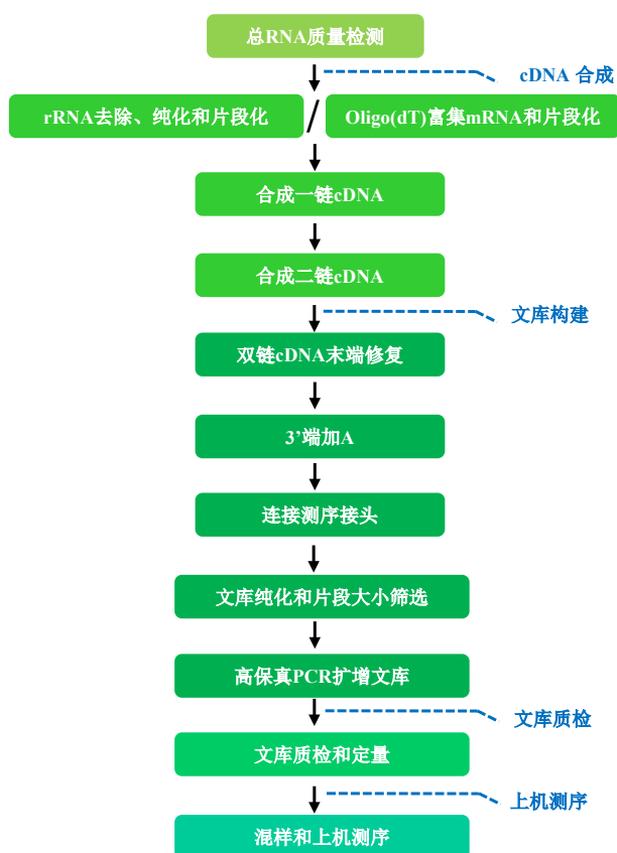
➔ 数据分析



mRNA 测序

mRNA 虽然只占细胞总 RNA 的 3% 左右，但由于其最终翻译成蛋白质，参与人类生长、发育、疾病发生发展等一系列的生物学过程，一直是研究的焦点。mRNA 高通量测序 (mRNA-seq) 是利用高通量测序技术，对特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的全部 mRNA 进行测序，全面快速得到基因表达谱变化的同时，还可以通过序列信息精确地分析转录本的 cSNP、可变剪切等序列及结构变异，另外对于检测低丰度转录本和发现新转录本具有其独特的优势。

➡ 技术路线



➡ 技术优势

- ◆ **全面的转录组分析：** 无需预先设计探针，直接进行最全面的转录组分析；
- ◆ **准确性高：** 数字化信号，直接测定每个转录本片段的序列；
- ◆ **检测阈值宽：** 跨越 6 个数量级的宽检测阈值，能同时鉴定及定量正常和稀有的转录本；
- ◆ **分辨率高：** 可以检测基因家族中相似基因及可变剪接造成的单碱基差异；
- ◆ **信息量大：** 除表达量外，还能提供转录本的边界鉴定、RNA 编辑、可变剪切、基因融合等信息。

→ 技术参数

样本要求	<ul style="list-style-type: none"> a. 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 50 ng/μL c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.2，OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本总量：总量 ≥ 2 μg e. 样本完整度：28S/18S ≥ 1.0，Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 6.5
文库类型	PolyA 富集的 mRNA 文库
测序策略	Illumina 2 \times 150bp；常规测 6G raw data

→ 数据分析

生物信息 分析内容	<ol style="list-style-type: none"> 1. 原始测序数据预处理 2. 数据质量过滤 3. 参考序列比对分析 4. 基因表达定量 5. 基因差异表达分析 6. 差异基因 GO 和 KEGG 富集分析 7. 新转录本预测（建议 ≥ 10G 数据量） 8. 可变剪切分析（建议 ≥ 10G 数据量） 9. 融合基因分析（建议 ≥ 10G 数据量） 10. SNV/InDel 分析（可选，建议 ≥ 10G 数据量） 11. lncRNA 标准分析，主要针对已知的 lncRNA 进行表达定量、差异分析等（可选，建议 ≥ 10G 数据量） 12. 信号通路作用网络（可选） 13. 差异基因调控关系网络（可选） 14. 基因集富集分析（GSEA）（可选，根据实际数据的整体趋势，与生物学意义很好地衔接起来，很可能发现部分差异表达不显著但却有重要生物学意义的基因） 15. 加权基因共表达网络分析（WGCNA）（可选，非重复样本数 ≥ 8 时可以考虑，但效果视实际情况而定，一般样本数 ≥ 15 时，效果更好，后者也是官方推荐的数目） 16. 基因表达趋势分析（STEM）（可选，针对多时间点、温度或药物浓度处理的样本） 17. 个性化信息挖掘（根据客户需求定制分析内容）
--------------	--

miRNA 测序

microRNA (miRNA) 是一种大小约 21-23 个碱基的单链小 RNA，miRNA 通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体 (RISC) 降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译，从而在转录后水平调控蛋白表达。基于 Illumina HiSeq 高通量测序技术的 miRNA-seq，可以一次获得数百万条 miRNA 序列，能够快速鉴定出不同组织、不同发育阶段、不同疾病状态下已知和未知的 miRNA 及其表达差异，为研究 miRNA 对细胞进程的作用及其生物学影响提供了有力工具。

技术路线



技术优势

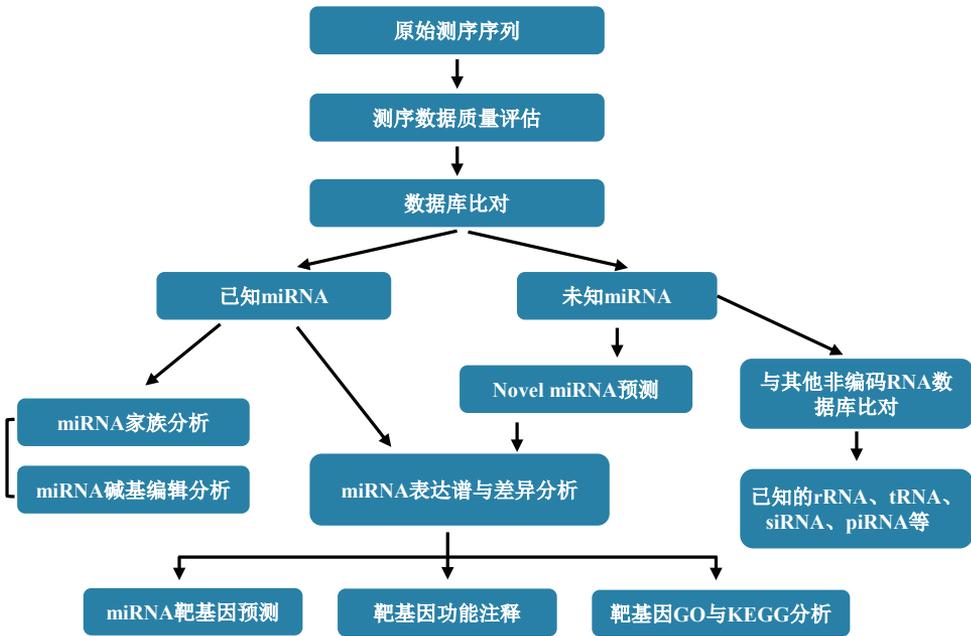
- ◆ **通量高**：一次测序可得到 10M reads；
- ◆ **分辨率高**：可以检测小 RNA 单个碱基的差异；
- ◆ **精准度高**：从几个到数十万个拷贝精确计数；
- ◆ **不依赖已知信息**：既能鉴定已知 miRNA，又能发现新 miRNA；
- ◆ **可重复性高**：深度测序保证了抽样随机性，重复性非常好，无需重复实验。

技术参数

miRNA 测序	
样本要求	a. 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 200 ng/ μ L c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.2，OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本总量：总量 ≥ 2 μ g e. 样本完整度：28S/18S ≥ 1.5 ，Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0
文库类型	small RNA 文库
测序策略	Illumina 2 \times 150bp：常规测 10M raw reads

➔ 数据分析

生物信息 分析内容	<ol style="list-style-type: none"> 1. 原始测序数据预处理 2. 数据质量过滤 3. 比对 Rfam 数据库，统计不同类型小 RNA 分布情况 4. 比对参考基因组，统计其覆盖程度 5. 与 miRBase 中已知的 miRNA 比对，并定量已知的 miRNA 表达水平 6. 预测新的 miRNA，绘制二级结构图，定量其表达水平 7. miRNA 差异表达分析 8. 差异 miRNA 靶基因预测 9. 差异 miRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析 10. miRNA 的 SNP 分析 11. 其它类型小 RNA（如 tRNA、piRNA、snRNA）的鉴定及表达定量和差异分析（可选） 12. 个性化信息挖掘（根据客户需求定制分析内容）
----------------------	---

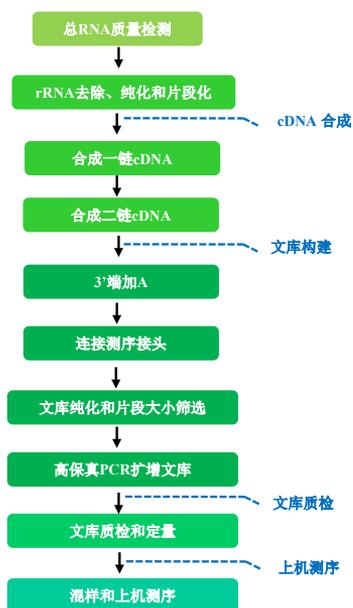


small RNA-seq 标准分析

lncRNA 测序

长链非编码 RNA (Long Noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度在 200-100000nt 之间的 RNA 分子。它们不参与蛋白质的编码，但是在细胞内起着重要的调控作用。已有的研究表明 lncRNA 参与 X 染色体沉默，基因组印记，表观遗传修饰，转录激活等多种生物学过程，越来越成为非编码 RNA 研究领域的一个热点。lncRNA 测序就是采用高通量测序技术结合生物信息分析，一次性获得样本中所有的 lncRNA 和 mRNA 信息，对 lncRNA 的类别、表达和功能进行深入分析的方法。

技术路线



技术优势

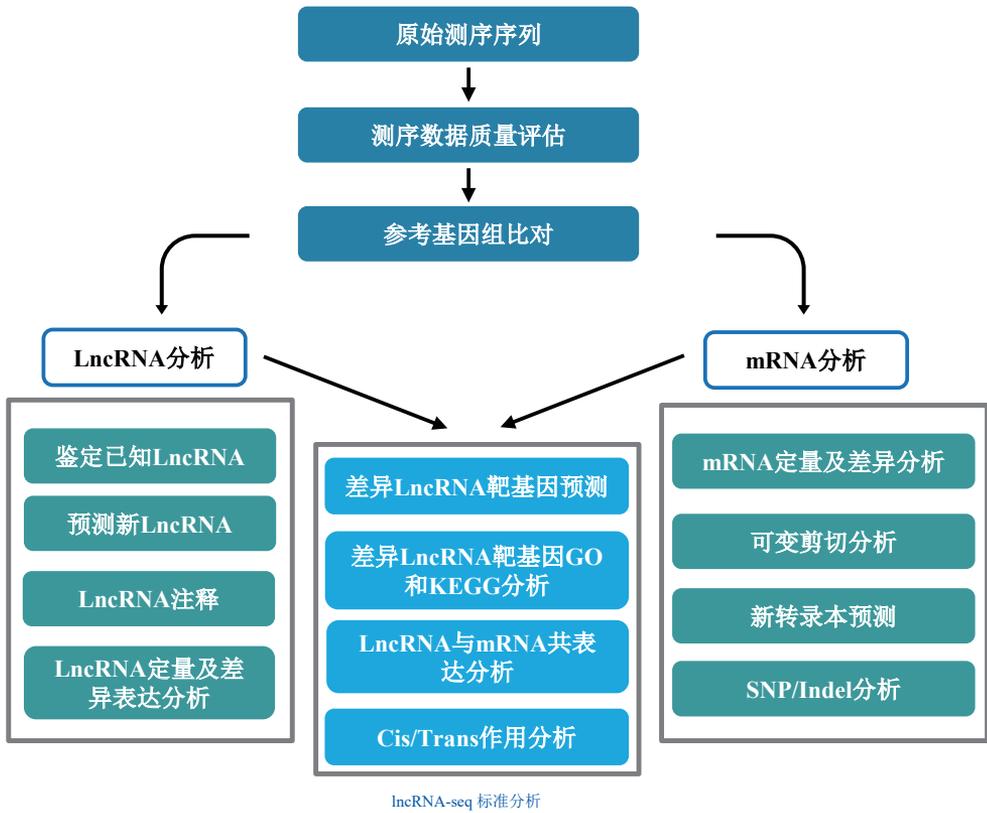
- ◆ LncRNA-seq 可利用一份 RNA 样品，同时获得 lncRNA 和 mRNA 的测序数据；
- ◆ 鉴定已知 lncRNA 的同时，可以预测新的 lncRNA；
- ◆ 信息量大，可进行 mRNA 和 lncRNA 共表达分析。

技术参数

lncRNA 测序 (含 mRNA)	
样本要求	a. 样本类型: 完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度: 浓度 ≥ 100 ng/ μ L c. 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.2, OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本总量: 总量 ≥ 2 μ g e. 样本完整度: 28S/18S ≥ 1.0 , Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0
文库类型	PolyA+ 链特异性文库 rRNA 去除 + 链特异性文库
测序策略	Illumina 2 \times 150bp; 常规测 10G raw data

➔ 数据分析

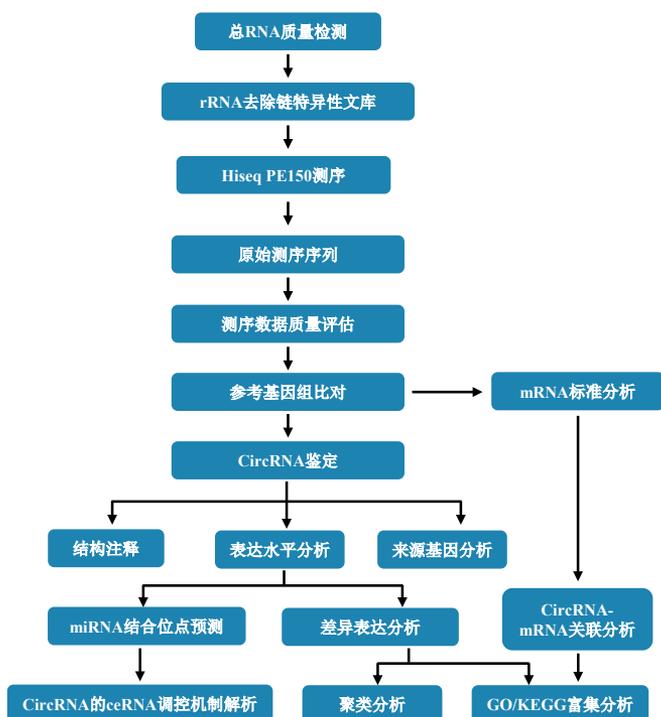
生物信息 分析内容	<ol style="list-style-type: none"> 1. 原始测序数据预处理 2. 数据质量过滤 3. 参考序列比对分析 4. 鉴定已知 lncRNA 5. lncRNA 表达定量 6. lncRNA 差异表达分析 7. 差异 lncRNA 靶基因预测 8. 差异 lncRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析 9. 新 lncRNA 预测 10. miRNA 结合位点注释 (可选) 11. mRNA 标准分析 (可选) 12. lncRNA 和 mRNA 联合分析 (可选) 13. 个性化信息挖掘 (根据客户需求定制分析内容)
----------------------	--



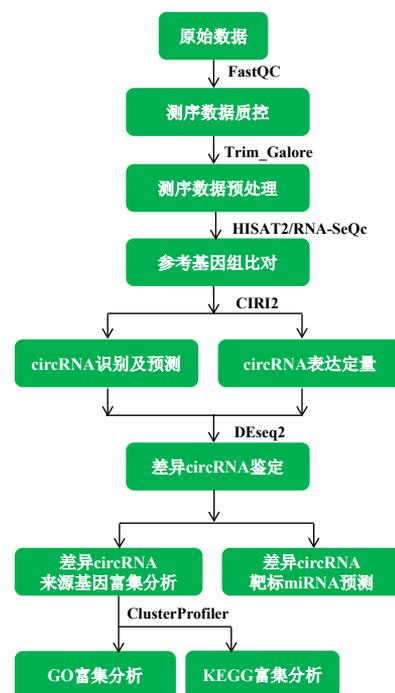
circRNA 测序

环状 RNA (circRNA) 是一类特殊的非编码 RNA 分子, 也是目前 RNA 领域最新的研究热点。与线性 RNA 不同, circRNA 分子呈封闭环状结构, 不受 RNA 外切酶影响, 表达更稳定, 不易降解。近几年的研究表明, circRNA 在生物的生长发育、对外界环境的抵御等方面具有重要的调控作用。由于 circRNA 的闭合环状特性, 通过去除 total RNA 中的 rRNA 和线性 RNA 分子, 可以特异地富集 circRNA 分子后进行测序, 更有针对性地分析受检样本中特定的 circRNA 谱、circRNA 剪接模式、组间差异和功能等。

技术路线



数据分析



技术优势

- ◆ 可同时获得 circRNA 和 mRNA 的测序数据;
- ◆ 鉴定已知 circRNA 的同时, 可以预测新的 circRNA;
- ◆ 信息量大, 可进行 mRNA 和 circRNA 共表达分析。

➔ 技术参数

常规 circRNA 测序（真核有参）	
样本要求	a. 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度：浓度 ≥ 100 ng/ μ L c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.2，OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本总量：总量 ≥ 2 μ g e. 样本完整度：28S/18S ≥ 1.0 ，Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0
文库类型	rRNA 去除链特异性文库
测序策略	Illumina 2 \times 150bp；常规测 12G raw data

➔ circRNA 研究常用数据库

数据库	主要功能	链接
CSCD	肿瘤与 circRNA，miRNA 结合位点及 RBP 等	http://gb.whu.edu.cn/CSCD/
circRNADisease	实验验证的 circRNA 与疾病关联数据库	http://cgga.org.cn:9091/circRNADisease
circBase	通过 circRNA 名称，转录本名称，染色体定位检索 circRNA 的信息	http://www.circbase.org/cgi-bin/listsearch.cgi
CircInteractome	circRNA 信息，miRNA 与 circ，RBP 与 circ，设计反向引物等	https://circinteractome.nia.nih.gov/
CIRCpedia v2	多个 RNA seq 数据中有关 circRNA 注释，不同细胞类型、组织及疾病样本中 circ 表达数据	http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia/
exoRBase	人体血液 exosome 中多种 RNA 数据	http://www.exorbase.org/
SomamiR 2.0	癌症中 miRNA 及靶位点的体细胞突变影响 miRNA 与 circ 等结合	http://compbio.uthsc.edu/SomamiR/
Circ2Disease	实验验证的 circRNA 与疾病关联数据库	http://bioinformatics.zju.edu.cn/Circ2Disease/circRNAgroup.html
CircNet	转录组测序数据来源的 circ 数据库	http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/
Circ2Traits	疾病与性状相关联的 circ 数据库	http://gyanxet-beta.com/circdb/

微量 mRNA 测序

微量 mRNA 扩增转录组测序利用 SMART-seq2 技术进行 mRNA 的高效、无偏好扩增和高通量测序，尤其适用于无法进行常规 mRNA 测序的微量样本。通过对特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的全部 mRNA 进行测序，在全面快速得到基因表达谱变化的同时，还可以根据序列信息精确地分析转录本的可变剪切及基因融合现象。

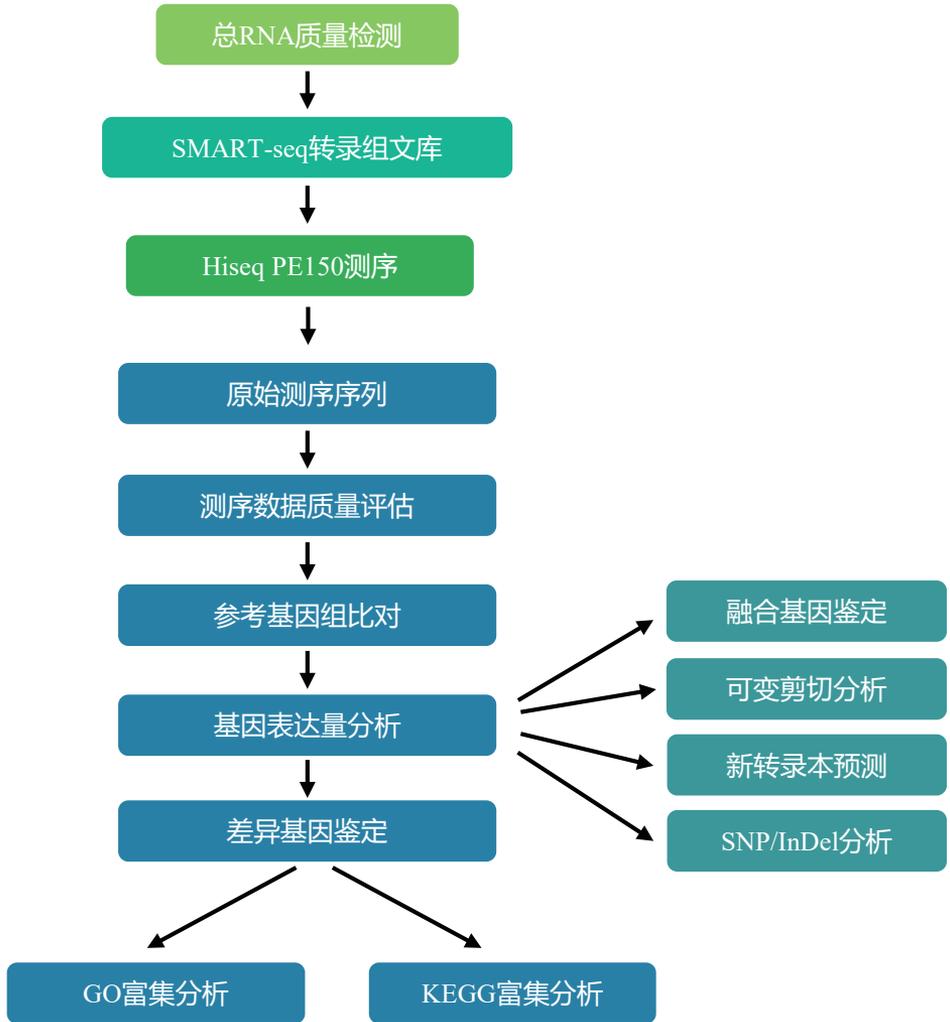
⇒ 技术优势

- ◆ **开放的全转录组分析：** 无需预先设计探针，直接对任何物种进行最全面的转录组分析；
- ◆ **准确性高：** 数字化信号，直接测定每个转录本片段的序列；
- ◆ **检测阈值宽：** 跨越 6 个数量级的宽检测阈值，能同时鉴定及定量正常和稀有的转录本；
- ◆ **分辨率高：** 可以检测基因家族中相似基因及可变剪切造成的单碱基差异；
- ◆ **起始量极低：** total RNA 总量仅需 > 400pg，适用于珍贵样本的测序。
- ◆ **高效可靠的扩增技术：** 灵敏度高、无偏好的扩增技术可以富集全长转录本，并且保持原始转录本的相对丰度。

⇒ 技术参数

微量 mRNA 测序	
样本要求	a. 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA b. 样本浓度：Qubit 检测，浓度 ≥ 50 pg/μL，总量 ≥ 400 pg c. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.2，OD260/230 ≥ 2.0 d. 样本完整度：28S/18S ≥ 1.0，Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0
文库类型	SMART-seq 扩增 poly(A)+ 文库
测序策略	Illumina 2×150bp；6G raw data
分析内容	基本分析 1) 原始测序数据预处理 2) 数据质量过滤 3) 参考序列比对分析 4) mRNA 表达定量分析 5) mRNA 差异表达分析 6) 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析 高级分析 7) 可变剪切分析 8) 新转录本预测 9) 融合基因分析 个性化分析 可结合客户的材料与需求，协商确定定制化信息分析内容。

⇒ 技术路线

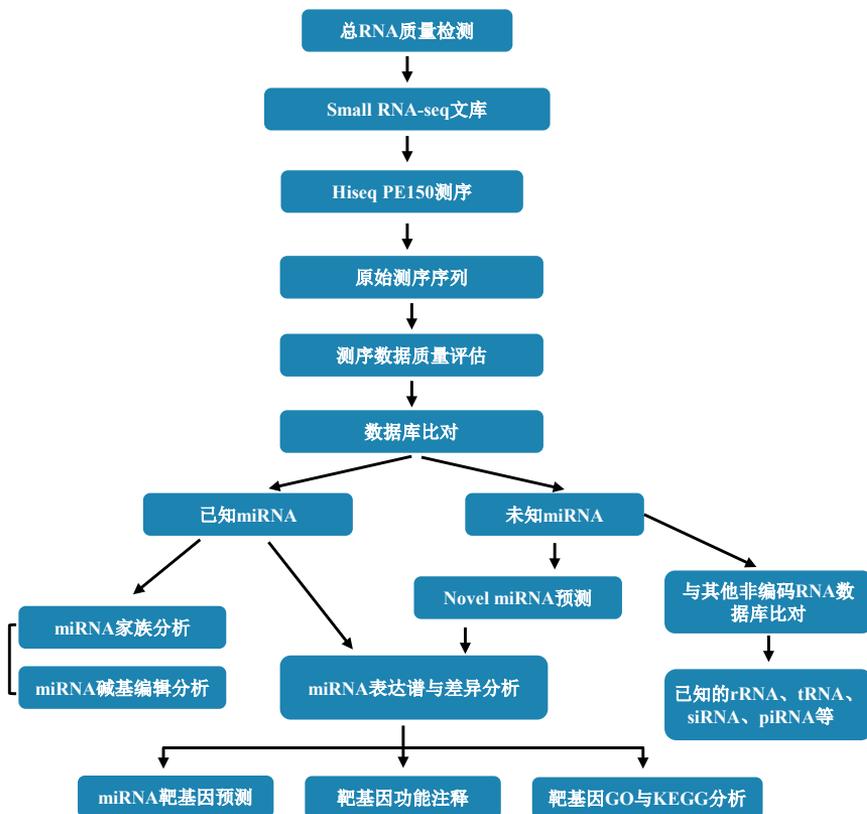


血浆、外泌体类样本 miRNA 测序

miRNA 是一类大小约 21-23 个碱基的单链小 RNA，miRNA 通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体（RISC）降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译，从而在转录后水平调控蛋白表达。细胞外游离 miRNA 通常以蛋白复合物或者外泌体的形式存在于真核生物血液、尿液、唾液、脑脊液等体液中。外泌体（Exosome）是真核细胞向外分泌的微型囊泡，直径在 30 至 100 nm 之间，其中所含 miRNA 的表达水平与来源细胞有明显不同，并且随生理条件的不同而变化，因而细胞外游离或外泌体 miRNA 具有作为液体活检分子标志物的潜力。

该服务采用成熟的技术富集不同体液来源的外泌体，对体液或者体液中的外泌体组分进行 RNA 抽提、miRNA-seq 文库构建、以及基于 Illumina HiSeq 进行高通量测序，可以一次获得数百万条 miRNA 序列，能够快速鉴定出不同组织、不同发育阶段、不同疾病状态下已知和未知的 miRNA 及其表达差异，为研究 miRNA 对细胞进程的作用及其生物学影响提供了有力工具。

➡ 技术及分析路线



➔ 技术优势

- ◆ **通量高：**一次测序得到 500 万条以上的序列
- ◆ **分辨率高：**可以检测小 RNA 单个碱基的差异
- ◆ **精准度高：**从几个到数十万个拷贝精确计数
- ◆ **不依赖已知信息：**既能鉴定已知 miRNA，又能发现新 miRNA

➔ 技术参数

血浆、外泌体类样本 miRNA 测序	
样本要求	a. 样品类型：无细胞 DNA 或 RNA 污染的，血浆类或者血浆外泌体类样本来源的 Total RNA b. 样品需求量：血浆样本 Qubit miRNA 检测，要求浓度 $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，总量 $\geq 20 \text{ ng}$ ；外泌体样本 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测，要求浓度 $\geq 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，总量 $\geq 10 \text{ ng}$ c. 样品 RNA 片段分布：Agilent 2100 Bioanalyzer 检测，要求 $< 200\text{nt}$ 片段占总 RNA 的比例 $> 60\%$ ，且 $500\text{nt}-4000\text{nt}$ 之间无明显可见片段
文库类型	small RNA 文库
测序策略	Illumina $2 \times 150\text{bp}$ ；常规测 10M raw reads

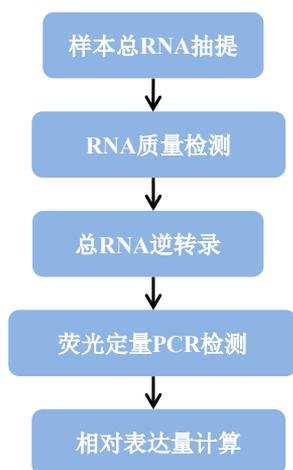
➔ 数据分析

生物信息 分析内容	基础分析
	1. 原始测序数据预处理
	2. 数据质量过滤
	3. 18~36nt small RNA 测序结果的长度分布
	4. 不同类型 small RNA (miRNA/rRNA/tRNA/snRNA/snoRNA) 分类注释
	5. small RNA 的基因组定位
	6. miRNA 与 miRBase 中已知的 miRNA 的比对
	7. 预测新的 miRNA，绘制二级结构图
	8. 已知 miRNA 和新 miRNA 的表达谱构建
	9. 已知 miRNA 家族分析
	10. 已知 miRNA 和新 miRNA 的靶基因预测
	高级分析
	1. 差异表达的已知 miRNA 和新 miRNA 靶基因 GO 注释
	2. 差异表达的已知 miRNA 和新 miRNA 靶基因 KEGG 通路分析
	3. 已知 miRNA 的 SNP 分析
	4. miRNA 和 mRNA 表达数据关联分析
	个性化分析
	可结合客户的材料与需求，协商确定定制化信息分析内容

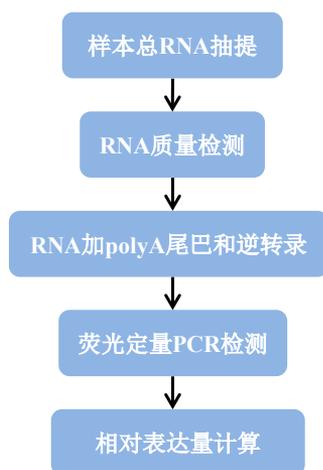
RNA 相对表达量 qPCR 检测

服务名称	样品要求	定量方法	数据质量	标准分析内容
常规 mRNA 定量	<ul style="list-style-type: none"> 需求量: Total RNA 总量 > 1 μg; 浓度 ≥ 50 ng/μL 纯度: OD260/280 介于 1.8-2.2 之间 完整度: RNA 无明显降解, 琼脂糖凝胶电泳 28S/18S 条带清晰可见 	ABI 7300/7900 荧光定量 PCR 仪, SyBr Green 相对定量法	<ul style="list-style-type: none"> Ct < 30 溶解曲线单一 两重复平行性好 	<ul style="list-style-type: none"> 靶基因与内参基因扩增曲线; 靶基因与内参基因溶解曲线; 靶基因与内参基因 Ct 值原始数据 (SDS 文件); 靶基因相对表达量分析数据及柱状图展示;
常规 lncRNA 定量	<ul style="list-style-type: none"> 需求量: Total RNA 总量 > 1 μg; 浓度 ≥ 50 ng/μL 纯度: OD260/280 介于 1.8-2.2 之间 完整度: RNA 无明显降解, 琼脂糖凝胶电泳 28S/18S 条带清晰可见 			
常规 miRNA 定量	<ul style="list-style-type: none"> 需求量: Total RNA 总量 > 500 ng; 浓度 ≥ 100 ng/μL 纯度: OD260/280 介于 1.8-2.2 之间 完整度: RNA 无明显降解, 琼脂糖凝胶电泳 28S/18S 条带清晰可见 			

技术路线



mRNA、lncRNA 及 circRNA 定量



常规 miRNA 定量

合作客户转录组相关文章集锦

文章	研究方向	合作单位
LncRNA TUBA4B functions as a competitive endogenous RNA to inhibit gastric cancer progression by elevating PTEN via sponging miR-214 and miR-216a/b	胃癌	中国医科大学附属第四医院
Calcium-activated nucleotidase 1 silencing inhibits proliferation, migration, and invasion in human clear cell renal cell carcinoma	肾透明细胞癌	陆军军医大学
The enhancer RNA Inc-SLC4A1-1 epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF-kB pathway	复发性流产	南京医科大学
Downregulation of hypermethylated in cancer-1 by miR-4532 promotes adriamycin resistance in breast cancer cells	乳腺癌	江苏大学
Signature microRNAs of nuclear Sm complex associated with breast cancer tumorigenesis	乳腺癌	杭州师范大学
Analysis of change in microma expression profiles of lung cancer A549 cells treated with Radix tetragyna hemisleyani flavonoids	肺癌	浙江省医学院医药资源研究中心
Angulin proteins ILDR1 and ILDR2 regulate alternative pre-mRNA splicing through binding to splicing factors TRA2A, TRA2B, or SRSF1	可变剪切	山东大学
Intranasal Delivery of miR-146a Mimics Delayed Seizure Onset in the Lithium-Pilocarpine Mouse Model	miRNA 治疗	广东医科大学附属医院

开放性染色质测序（ATAC-seq）

真核生物的染色质通常情况下以核小体为单位进行致密的折叠，不表现出转录活性，同时部分开放的染色体区域作为特异性反式作用因子（如转录因子，酶等）和顺式作用元件（如增强子，绝缘子等）与基因组 DNA 相互作用的活跃区域。这种由染色质的开放程度定义的染色质可接近性（Chromatin Accessibility）对细胞的基因的表达，DNA 的复制和修复等生命活动产生重要的影响，并且时刻受到细胞的严格调控。因此检测特定时空状态下细胞染色质的开放程度（从关闭状态到半开放，从半开放到完全开放），是探索染色质结构重塑（Chromatin Remodeling）对生物的生长发育、疾病的发生发展影响的重要研究方向。

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) 方法利用高灵敏度的转座酶（Transposase, Tn5）在寻找染色质上可接近位置的同时对染色质 DNA 进行片段化和接头连接，进而进行高通量测序。细胞需求量在 50000 个左右，更适合数量有限的临床和珍贵样本，实验操作上更方便快捷，是一种创新的单碱基分辨率的表观遗传学研究技术。目前该技术已被广泛应用于揭示染色质丰富的表观调控信息、不同状态下开放染色质的变化，以及多种疾病中开放染色质图谱的绘制等，同样适用于真核细胞重编程及单细胞染色质开放性的研究，在医学领域是重大疾病发病机制、药物作用机制、新药研发和生物标志物等研究的重要利器。

技术路线



➡ 技术优势

- ◆ **低细胞量需求：**细胞量需求少，适合数量有限的临床和珍贵样本。
- ◆ **高性价比：**实验耗时短，实验安排灵活，仅需较少数据量获得全基因组范围内有效调控信息。
- ◆ **全基因组覆盖：**全基因组范围单碱基水平对染色质开放区域进行筛选与鉴定。
- ◆ **高精确率：**精确捕获开放染色质区域，获得调控序列信息，可同时对核小体信息进行研究。

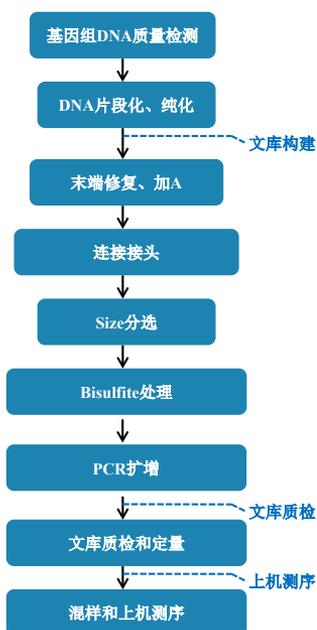
➡ 技术参数及分析内容

ATAC-seq		
样本要求	医学细胞样品	a. 样品保存 / 运输要求： （活细胞）细胞培养液保存于细胞培养瓶，常温运输 （冻存细胞）保存于细胞冻存液，干冰运输 b. 样品总量：单次实验 $\geq 5 \times 10^4$ 细胞，请尽可能提供两次以上的用量 c. 样品质量：细胞样本活细胞比例 $\geq 80\%$ ，无外源污染
	医学组织样品 (需评估)	a. 样品保存和运输条件 （新鲜组织）单细胞悬液，细胞培养瓶保存，常温运输 （冻存组织）干冰运输 b. 样品总量：单次实验 ≥ 1 mg 组织，请尽可能提供两次以上的用量 （若客户样本为组织，且无条件进行组织解离来获取单细胞，公司尽可能提供技术及实验上的帮助）
	动植物样品 (需评估)	a. 细胞 $\geq 1 \times 10^6$ b. 动物组织 ≥ 50 mg c. 植物组织 ≥ 500 mg 其它类型样品用量及要求需详询
文库类型	DNA 文库	
测序策略	Illumina 2×150bp；常规测 15G raw data	
分析内容	基本分析： 1) 原始数据整理、过滤及质量评估； 2) 参考基因组注释信息整理； 3) 比对到参考基因组及结果评估； 4) Peak Calling； 5) Peak Motif 分析； 6) 差异 Peak 分析； 7) 差异 Peak 注释与筛选； 8) 差异 Peak 可视化展示； 9) 差异 Peak 聚类热图； 10) 差异 Peak 相关基因 GO 富集分析； 11) 差异 Peak 相关基因 KEGG 富集分析。 高级分析： 与 RNA-seq 数据、甲基化数据等进行联合分析	

全基因组甲基化测序

全基因组重亚硫酸盐测序（Whole Genome Bisulfite Sequencing）是基于重亚硫酸盐处理的甲基化分析方法，首先通过重亚硫酸盐对样本 DNA 进行处理，将未甲基化的 C 碱基转化为 U 碱基，而甲基化的 C 碱基不会改变，进行 PCR 扩增后 U 碱基会变成 T，与原本甲基化的 C 碱基区分开，再结合高通量测序技术，可绘制单碱基分辨率的全基因组 DNA 甲基化图谱。

技术路线



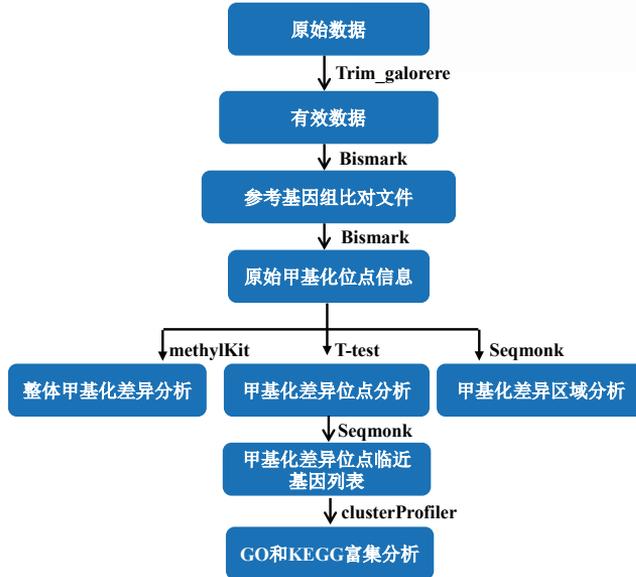
技术优势

- ◆ 可精确分析每一个 C 碱基的甲基化状态
- ◆ 可在全基因组水平上最大限度的获取完整的甲基化信息，精确绘制全基因组甲基化图谱
- ◆ 适用于所有具有参考基因组的物种，性价比高，相对于传统 BSP 或 MSP 方法费用少

技术参数

样本要求	测序策略	数据要求
<ul style="list-style-type: none">• 样本类型：完整无污染的基因组 DNA• 样本浓度：浓度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$• 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0，OD260/230 ≥ 2.0• 样品需求量：总量 $\geq 4 \mu\text{g}$	Illumina 2×150bp	一般建议测序基因组大小的 30× 数据量

➔ 数据分析



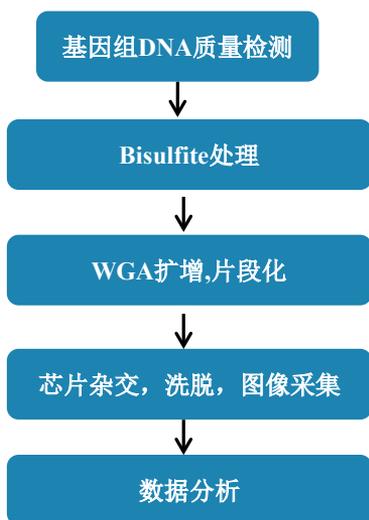
➔ 甲基化研究常用数据库

数据库	主要功能	链接
Pancan-meQTL	人类多癌种中进行 meQTL 分析	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/Pancan-meQTL/
EWASdb	表观基因组关联研究数据库 (EWAS)	http://www.ewas.org.cn/ewasdb
MethBank 3.0	多物种 DNA 甲基化组数据库	http://bigd.big.ac.cn/methbank
MeDReaders	结合到甲基化 DNA 的 TF 数据库	http://medreader.org/
DiseaseMeth version 2.0	人类疾病相关甲基化数据库	http://bioinfo.hrbmu.edu.cn/disease-meth/
NGSmethDB 2017	全基因组范围内甲基化数据, 差异甲基化数据	http://bioinfo2.ugr.es/NGSmethDB
MethHC	人类癌症中 DNA 甲基化及表达数据, 来源于 TCGA	http://MethHC.mbc.nctu.edu.tw
MethBank	多种模式生物中甲基化组数据整合	http://dnamethylome.org

illumina 850k 甲基化芯片检测

就甲基化图谱分析而言，目前性价比较高的分析方法是甲基化芯片检测。天昊目前提供最新的 Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip（850k 芯片）检测服务。850k 芯片可检测人全基因组约 853,307 个 CpG 位点的甲基化状态，其中包含了原 450k 芯片 90% 以上的位点，并增加了 413,745 个位点。850k 芯片不仅保持了对 CpG 岛，基因启动子区的全面覆盖，还特别增加了增强子区（新增探针覆盖 ENCODE 及 FANTOM5 数据库中的增强子）、miRNA 启动子区域、肿瘤中差异甲基化位点以及 DNase 超敏感位点等探针覆盖。该芯片是目前最适合甲基化图谱分析研究的一项工具。

技术路线



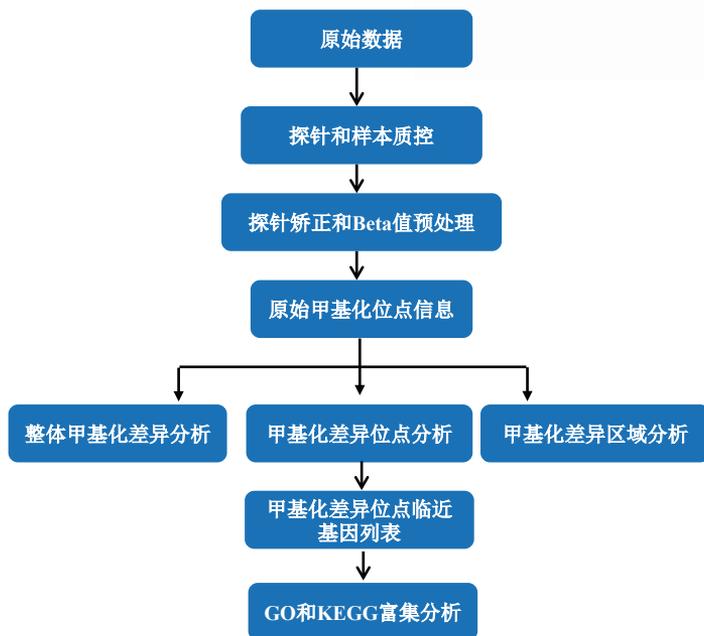
技术优势

- ◆ **高通量：**可同时检测 > 850,000 个位点
- ◆ **全面覆盖：**覆盖 > 95% 的 CpG 岛，99% 的 RefSeq 基因，保留了 > 90% 的 450k 甲基化位点
- ◆ **覆盖增强子区域：**在增强子区域新增了 350,000 个甲基化位点（包括 ENCODE enhancers, FANTOM5 enhancers）
- ◆ **分辨率高：**单碱基分辨率
- ◆ **重复性高：**技术重复的重现性 > 98%，与 450k 芯片的重复性 > 98%

技术参数

样本要求	检测策略	其它说明
<ul style="list-style-type: none">• 样本类型：完整无污染的基因组 DNA• 样本浓度：浓度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$• 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0，OD260/230 ≥ 2.0• 样品需求量：总量 $\geq 1 \mu\text{g}$	芯片杂交检测	<ul style="list-style-type: none">• 可检测 FFPE 样本• 使用 Infinium 技术，无其它甲基化 DNA 捕获方法常有的偏向性

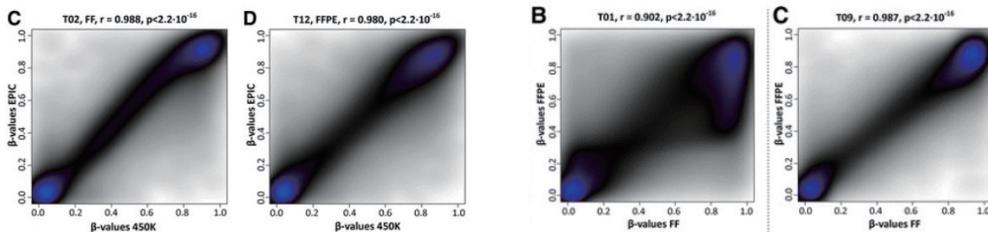
➔ 数据分析



➔ Illumina 技术验证

由于 Illumina HumanMethylation 450 BeadChip (450k) 最近被甲基化 EPIC BeadChip (EPIC) 取代，因此 2017 年的 *Clinical Epigenetics* 杂志发表了该 850k 芯片的技术性验证文章。该研究采用两种芯片，分别检测新鲜冷冻 (FF) 和福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 肿瘤样本的甲基化，检测结果发现：

- 对于 FF 样本，2 种芯片结果一致性系数平均达到 0.992；
- 对于 FFPE 样本，2 种芯片结果一致性系数平均达到 0.984；
- 基于 EPIC 芯片，FFPE 样本的 β 值与配对 FF 肿瘤样本的 β 值相关性达到 0.901-0.987；



对于 FF 样本，2 种芯片结果一致性

对于 FFPE 样本，2 种芯片结果一致性

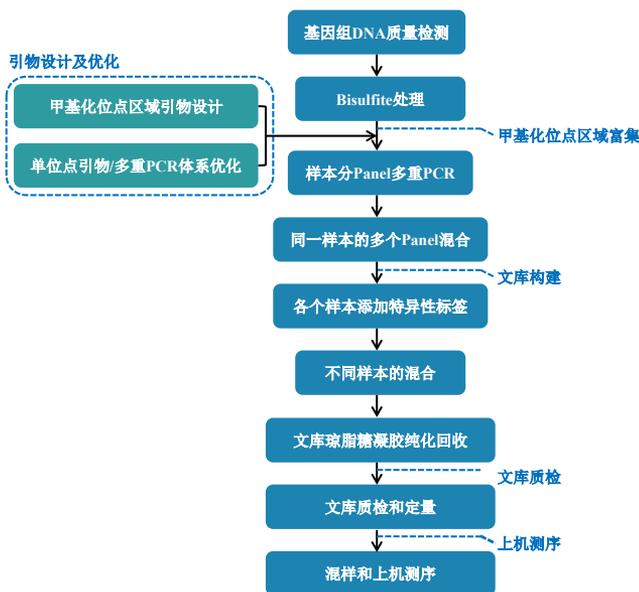
基于 EPIC 芯片，FFPE 样本的 β 值与配对 FF 肿瘤样本的 β 值相关性

MethylTarget[®] 多重目的区域甲基化富集测序

作为一种重要的表观遗传学标记，DNA 甲基化修饰参与调控基因表达、染色质稳定性等最基础的生命活动。甲基化多态性是个体表型差异的重要原因，甲基化变异也可能导致个体表型异常。已有大量研究表明甲基化异常和癌症、糖尿病、帕金森等多种复杂疾病密切相关，甲基化检测对生物学、转化医学等研究具有重要意义。基于芯片以及二代测序平台，已有多种实验方法能够用于全基因组甲基化检测，包括全基因组甲基化测序和 Illumina 850k 甲基化芯片检测等。而针对目的区域的甲基化检测，目前仍多通过传统方法，如 MSP（Methylation-Specific PCR，甲基化特异 PCR）和 BSP（Bisulfite-Sequencing PCR，甲基化 PCR 测序）等方法实现，通量小，成本高，且无法准确计算位点或区域的甲基化水平。天昊生物依托公司多重 PCR 的专利技术，结合二代测序平台开发的 MethylTarget[®] 技术，实现对多个特定 CpG 岛同时捕获测序，并凭借高深度测序数据，能够准确计算每个 CpG 位点的甲基化水平。该技术准确性高，灵活性强，性价比优，适用于临床组织、血浆、cfDNA 及 FFPE 样本的 DNA 甲基化研究。

技术路线

技术优势

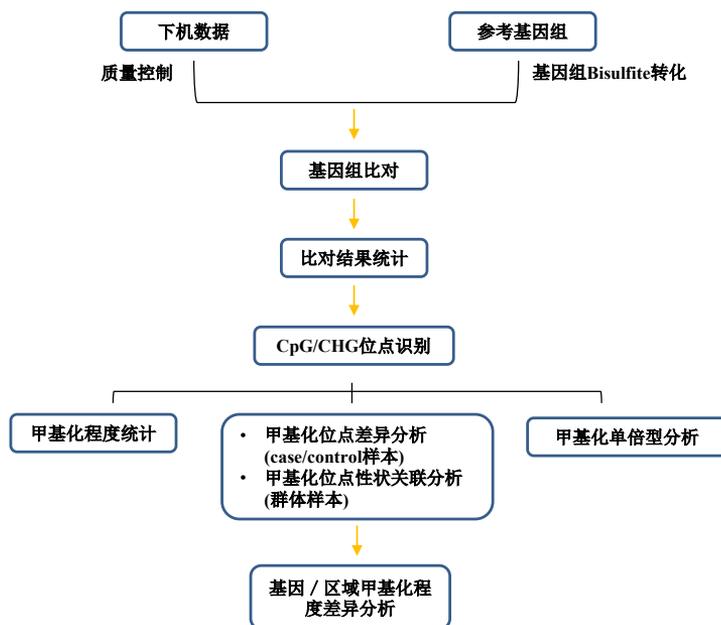


- ◆ 基于二代测序，可以获得目标区域内所有 C 碱基的甲基化数据。
- ◆ 1000× 的测序深度，精确计算每个 C 碱基的甲基化程度。
- ◆ 通量高，可同时有成百上千个区域进行甲基化程度分析。
- ◆ 适用于大样本多区域的 DNA 甲基化水平检测。

➔ 技术参数

MethylTarget® 多重目的区域甲基化富集测序		
样本要求	组织	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样本类型：完整无污染的基因组 DNA 2. 样本浓度：浓度 ≥ 20 ng/μL 3. 样本纯度：OD260/280 介于 1.8-2.0, OD260/230 ≥ 2.0 4. 样品需求量：总量 > 1 μg（满足 70 个目的片段测序）
	血浆	<ol style="list-style-type: none"> 1. 新鲜分离的血浆，-80°C 冻存，干冰送样； 2. 样品需求量，至少 3 ml 血浆。
	已抽提 cfDNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 溶解于蒸馏水或 TE (pH 8.0) 中的 cfDNA，干冰运输； 2. 样品需求量：Qubit 检测，要求浓度 ≥ 1 ng/μL，总量 ≥ 20 ng（至多 5 个片段）； 3. 样品完整度：样本无色透明，粘度低，Agilent 2100 检测在 160bp 处有峰且无大片污染。
	FFPE	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样品类型：溶解于蒸馏水或 TE (pH 8.0) 中的 FFPE 样本抽提 DNA； 2. 样品需求量：Qubit 检测，要求浓度 ≥ 20 ng/μL，总量 ≥ 200 ng(10 个片段) 每增加一个片段需要 20 ng； 3. 样品纯度：样本无色透明，粘度低，琼脂糖凝胶电泳检测无挂孔，且无 RNA 污染。
文库类型	扩增子测序文库	
测序策略	Illumina 2 \times 150bp	
数据量与质控标准	<ol style="list-style-type: none"> 1. 提供 Illumina 2\times150bp 测序数据，所有样本原始测序数据碱基 Q30 比例 $> 70\%$； 2. 所有组织样本目标区域测序深度平均 $> 1000\times$，Q30 $> 80\%$； 3. 90% cfDNA 样本所有扩增子平均测序深度 $> 5000\times$； 4. 90% FFPE 样本所有扩增子平均测序深度 $> 500\times$。 	
分析内容	<p>基本分析：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原始数据整理及质量评估 2. 胞嘧啶转化效率统计 3. CpG 位点甲基化水平计算 4. CpG 位点甲基化单倍型分析 5. 甲基化水平相似性分析（PCA 分析，聚类分析） 6. 甲基化水平差异分析 <p>高级分析：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. SNV 分析 	

➔ 数据分析



➔ 合作客户高分文章

文章	研究方向	合作单位
Decreased functional connectivity of hippocampal subregions and methylation of the NR3C1 gene in Han Chinese adults who lost their only child, 2020, IF: 5.641	心理学; 目的区域甲基化	东部战区总医院
SOCS1 blocks G1-S transition in hepatocellular carcinoma by reducing the stability of the CyclinD1/CDK4 complex in the nucleus, 2020, IF: 5.515	肝癌; 目的区域甲基化	浙江大学医学院附属第一医院
CCND1, NOP14 and DNMT3B are involved in miR-502-5p-mediated inhibition of cell migration and proliferation in bladder cancer, 2020, IF: 5.039	膀胱癌; 目的区域甲基化	浙江大学医学院附属第一医院
Integrated DNA methylation and gene expression analysis in the pathogenesis of coronary artery disease, 2019, IF: 5.515	冠心病; 目的区域甲基化	广西医科大学
Rheumatoid arthritis-associated DNA methylation sites in peripheral blood mononuclear cells, Annals of the Rheumatic Diseases, 2018, IF:12.35.	类风湿性关节炎; 单核细胞; 全基因组 / 目的区域甲基化	苏州大学
Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Systemic Sclerosis Reveals Hypomethylation of IFN-Associated Genes in CD4+ and CD8+ T Cells, the Journal of Investigative Dermatology, 2018, IF:6.448.	硬化症; T细胞; 全基因组 / 目的区域甲基化	复旦大学

m6A 甲基化修饰总体水平定量

N6-甲基腺嘌呤 (m6A) 是真核生物中最为常见和最为丰富的 RNA 分子修饰。本检测方法采用 EpiQuik m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒，通过比色的方法定量总 RNA 中 m6A 的修饰程度，适用于哺乳动物、植物、真菌、细菌和病毒等物种。检测原理是在特定的结合缓冲液中，将待检测的 total RNA 或者标准品结合到微孔板表面，然后依次加入特异性的 m6A 抗体，检测抗体和显色试剂，最终显示的颜色深浅与样品中 m6A 的浓度呈正比，利用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线即可计算样品中 m6A 的绝对含量，同时通过 total RNA 总量校正可对不同样本中 m6A 含量进行比较。

技术路线



技术优势

- ◆ 采用商品化试剂盒进行测定，稳定性高，重复性好。
- ◆ 采用 ELISA 方法进行检测，检测灵敏度高，可检测低至 10 pg 的 m6A。
- ◆ 抗体特异性好，检测结果不受非甲基化碱基的影响。
- ◆ 结合缓冲液保证 RNA 的高效结合，可检测长度 > 70 nt 的 mRNA 和 ncRNA。
- ◆ 适用范围广，可检测哺乳动物、植物、真菌、细菌等物种来源的样本。

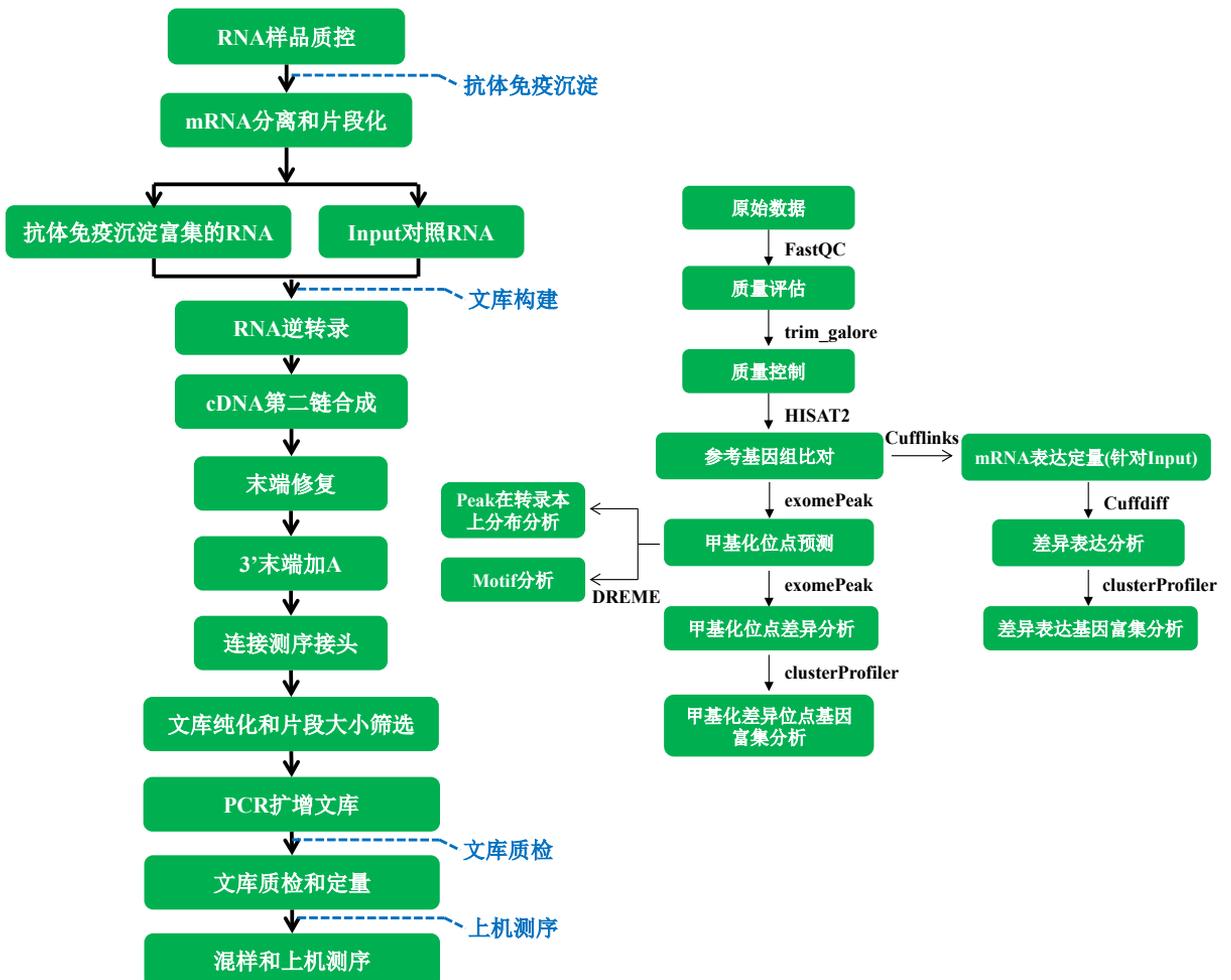
技术参数

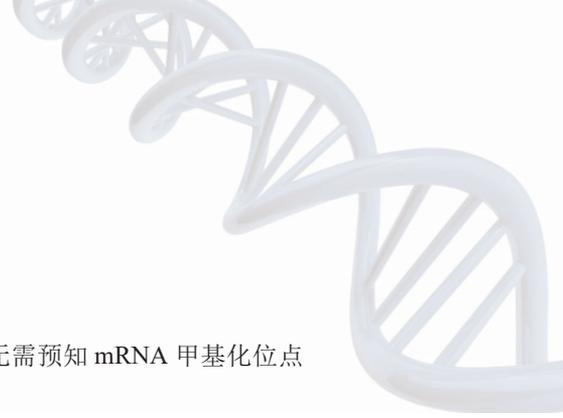
RNA m6A 甲基化总体水平定量	
样本要求	<ul style="list-style-type: none">• 样品类型：无基因组 DNA 污染的 total RNA• 样品需求量：总量 ≥ 2 μg，浓度 ≥ 100 ng/μL• 样品纯度：OD260/280 介于 1.8-2.2• 样品完整度：琼脂糖凝胶电泳 28S/18S 条带清晰可见，无明显降解
分析内容	<ul style="list-style-type: none">• 绘制标准曲线• 计算待测样本 m6A 含量

m6A RNA 甲基化测序 (MeRIP-seq)

m6A RNA 甲基化修饰是真核生物 mRNA 和 lncRNA 上一种普遍的 RNA 修饰方式，参与多种转录后调控过程。最新的研究表明 m6A 修饰在多种生物学过程和疾病中发挥重要作用。m6A RNA 甲基化测序是以 RNA 免疫共沉淀 (RIP) 为基础，采用特异抗体对发生 m6A 甲基化修饰的 RNA 片段进行富集后测序的技术手段，可以获得特定细胞在某一调控功能状态下或者特定发育阶段的 mRNA m6A 甲基化修饰图谱，并且可比较多个细胞间差异。在特定细胞样本中可利用该技术研究受 RNA 甲基化调控酶影响的靶标 mRNA 和 lncRNA 等，不仅能揭示靶标 RNA 的 m6A 修饰状态的变化，而且结合转录组测序数据能够分析 RNA 表达水平变化，继而研究 m6A 修饰如何在转录后水平上影响 RNA 稳定性和翻译等。

技术 & 分析路线





➔ 技术优势

- ◆ **开放的全转录组分析：**无需预先设计探针，无需预知 mRNA 甲基化位点信息。
- ◆ **信息量大：**在全转录组水平上获得 mRNA 和 poly(A) + lncRNA 的甲基化修饰区域信息。
- ◆ **准确性高：**以未经抗体富集的 mRNA 文库作为 input 对照，校正 mRNA 表达量的影响，获得准确可靠的甲基化区域信息。

➔ 技术参数

m6A RNA 甲基化测序	
样本要求	<ul style="list-style-type: none"> • 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA • 样本需求量：总量 ≥ 100 μg，浓度 ≥ 200 ng/μL • 样本纯度：OD260/280 = 1.8~2.2，OD260/230 ≥ 2.0 • 样本完整度：Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RIN 值 ≥ 7.0，28S/18S ≥ 1.0
文库类型	Poly(A)+ 文库
测序策略	Illumina 2×150bp；常规测 12G raw data (Input 和 IP 两个文库各 6G raw data)

➔ 数据分析

生物信息 分析内容	<p>基础分析</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原始测序数据预处理 2. 数据质量过滤 3. 参考序列比对分析 4. mRNA 表达定量分析（基于 Input 文库） 5. 甲基化区域预测 6. 甲基化区域 motif 分析 7. 甲基化的转录本分布特征分析 8. 甲基化差异分析与基因注释 9. 甲基化差异基因 GO 富集分析 10. 甲基化差异基因 KEGG 富集分析 <p>高级分析</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. mRNA 表达与甲基化联合分析 <p>个性化分析</p> <p>可结合客户的材料与需求，协商确定定制化信息分析内容。</p>
--------------	---

宏基因组测序

宏基因组(metagenome)是指特定环境中全部生物(微生物)遗传物质 DNA 的总和。宏基因组测序研究就是对一个环境样品内所有微生物 DNA 进行测序,然后将测序序列与已知物种序列数据库进行比对,从而能够获得样本微生物的群落结构组成;同时进行序列拼接组装、基因预测,从而了解该环境样本中微生物的功能基因,进而分析差异基因和差异功能等。总的来说,宏基因组关注三个最核心的问题:菌落结构;功能基因;功能通路。

技术路线



技术优势

- ◆ 宏基因组比微生物个体研究更能反映微生物生存的真实状态
- ◆ 宏基因组测序直接对环境中的所有微生物进行测序
- ◆ 使用高通量测序,能够获得低丰度物种的功能信息
- ◆ 构建不同物种之间协同的代谢网络

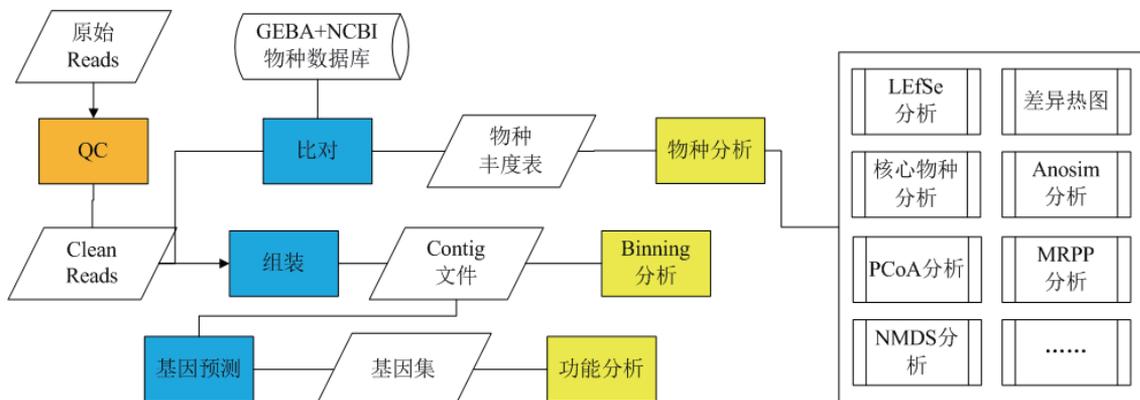
技术参数

宏基因组测序	
样本要求	<ul style="list-style-type: none">• 样本类型: 完整无污染的基因组 DNA;• 样本浓度: 浓度 $\geq 25\text{ng}/\mu\text{L}$;• 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.0, OD 260/230 ≥ 2.0;• 样本总量: 总量 $\geq 2\ \mu\text{g}$;• 样本安全性: 甲方需确保所提供的样本无致病性, 合同生效时默认甲方对样本的安全性做出承诺。若因样本具有致病性从而威胁到公共安全, 甲方需承担相应的一切责任。
测序策略	illumina 2 \times 150bp
数据要求	<ul style="list-style-type: none">• Q30>80%• 根据不同环境的微生物组成复杂度估计测序数据量, 5-20G 不等

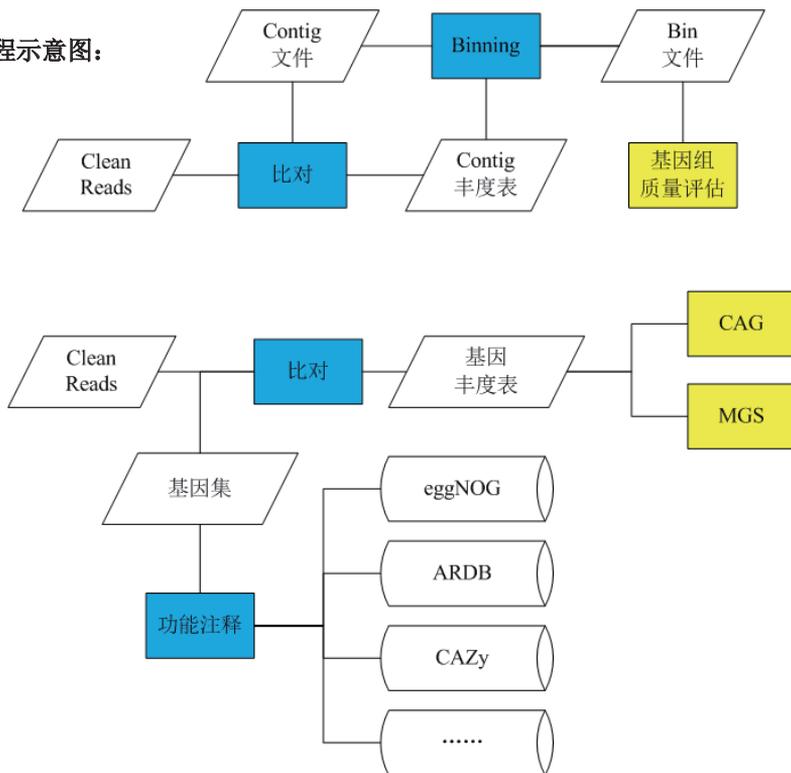


➔ 数据分析

◆ 基础分析流程示意图:



◆ 功能分析流程示意图:



标准分析内容			
数据质控			
原始数据统计	√	质控数据统计	√
物种注释与差异物种分析			
物种注释统计	√	主成分分析 (PCA 分析)	√
单样本物种组成分析	√	物种 Anosim 分析	√
各样本物种分析	√	物种 MRPP 分析	√
核心物种统计分析	√	非度量多维尺度分析 (NMDS)	√
物种累积曲线	√	主坐标分析 (PCoA 分析)	√
物种稀释曲线	√	物种秩和检验差异分析	√
优势物种分析	√	物种 STAMP 差异分析	√
三角 Ternary 图	√	物种 LEfSe 差异分析	√
优势物种聚类分析	√		
组装			
序列拼接组装	√		
基因集构建与差异基因分析			
基因预测	√	基因 Anosim 分析	√
基因集构建	√	基因 STAMP 差异分析	√
基因丰度表构建	√	基因秩和检验差异分析	√
功能注释分析			
KEGG 数据库注释分析	√	主成分分析 (PCA 分析)	√
KEGG Anosim 分析	√	KEGG 的 LEfSe 差异分析	√
KEGG STAMP 分析	√	eggNOG 数据库功能注释分析	√
KEGG 主成分分析 (PCA 分析)	√	基于 CAZy 碳水化合物活性酶数据库注释分析	√
KEGG 优势 KO 热图分析	√	基于 ARDB 耐药基因数据库功能注释分析	√
KEGG 秩和检验差异分析	√	基于 VFDB 毒力因子数据库功能注释分析	√

➔ 常见问题

问题	回答
宏基因组测序量如何判断?	如果微生物多样性比较低, 例如像肠道微生物, 每个样品测个 5-10G 数据足够。
宏基因组测序需要设置生物学重复吗?	需要, 建议最少是 5 个生物学重复。如果要做比较高级的分析例如 MGS, 对组内至少 5 个生物学重复, 总样本量至少 20 个。

细菌 16S/ 真菌 18S/ITS 扩增子测序

扩增子测序就是通过对基因组目的区域进行 PCR 扩增，将目标区域 DNA 扩增富集后进行高通量测序，然后将得到的序列与特定数据库比对，确认物种，然后进行生物信息分析的研究策略。目前扩增子测序服务主要包括细菌 16S rDNA 区 / 真菌 ITS1 区 / 真菌 ITS2 区 / 真菌 18S rDNA 区以及后续的数据分析工作，可有效研究特定环境中的物种信息，包括：物种分类、物种丰度、物种差异，对粪便、口腔、呼吸道、皮肤、生殖道、土壤、水体、淤泥等复杂环境中的微生物构成研究有重要的指导作用。

16S rDNA 测序：16S rRNA 为核糖体的 RNA 的一个亚基，16S rDNA 就是编码该亚基的基因，存在于所有细菌基因组。16S rDNA 大小适中，约 1.5kb 左右，16S rDNA 具有 10 个保守区和 9 个高变区 (V1-V9)，其中保守区在细菌间差异不大，高变区具有高度的特异性，因此可以通过对某个或某些高变区进行测序，从而对细菌菌落结构多样性进行分析。

18S rDNA 测序：18S rDNA 为编码真核生物核糖体小亚基 rRNA 的 DNA 序列。在结构上分为保守区和高变区，保守区反映生物物种间的亲缘关系，高变区反映物种间的差异，18S rDNA 在进化速率上相对于 ITS 更加保守。

ITS 测序：在真核生物中，18S rDNA 和 28S rDNA 转录间隔序列称为 ITS 区。ITS 分为两个区域：ITS1/ITS2，ITS1 位于 18S 和 5.8S 之间，ITS2 位于 5.8S 和 28S 之间。ITS 由于是非转录区，承受的选择压力较小，变异强。

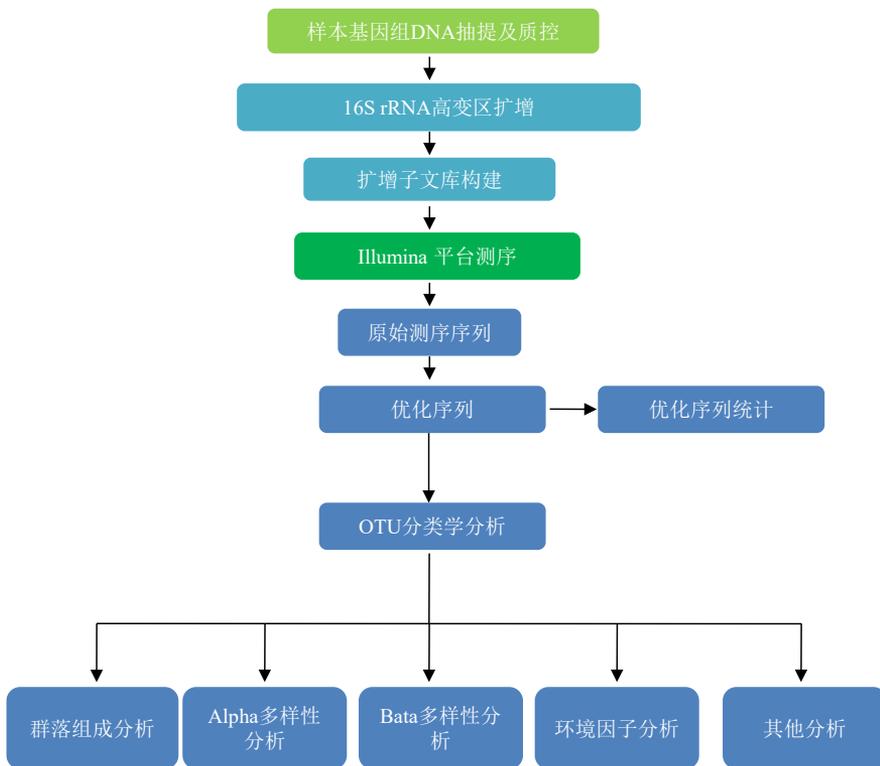
➡ 技术参数

测序类型	推荐区域	样本要求	测序策略	数据要求
16S rDNA 测序	V3 V4 V3+V4 (肠道推荐) V4+V5 (土壤推荐)	类型：样本 DNA，样本无明显降解，冰袋或干冰运输 总量：> 500 ng 浓度：≥ 20 ng/μL 纯度：OD260/280 = 1.8-2.0 类型：实验样品，干冰运输 人粪便样本：≥ 2 g 鼠粪便样本：≥ 0.5 g 肠道内容物：≥ 2 g 肠道粘膜：≥ 2 g 皮肤样本：5 个棉签 唾液：≥ 4 ml 口腔拭子：≥ 4 个拭子 土壤：≥ 5 g	Miseq 2×250 Hiseq 2×250	clean data Q30 > 80% 每个样本 > 5 万条有效序列
18S rDNA 测序	V4 V9	水体：过滤过 1-10L 水样的滤膜 2 片 活性污泥及海洋沉积物：≥ 10 g 发酵曲：≥ 1 g 发酵食品：≥ 10 g 鱼子酱：≥ 1 g 植物叶片表面微生物：10 片以上 空气：不同孔径大小的滤膜一张		
ITS rDNA 测序	ITS1 ITS2			

➔ 技术优势

- ◆ 无需培养分离菌群，直接针对环境样本进行扩增子测序
- ◆ 高通量测序，大数据量、低花费
- ◆ PCR 扩增设置多次重复，低循环数扩增，客观还原菌群结构及丰度比例
- ◆ 可发现环境微生物群落中新的微生物和基因，以及检测痕量菌

➔ 技术路线



常见问题

问题	回答
测序区段如何选择?	通过查找文献找到目标样本所用的区段, 一般 16S 扩增子测序肠道样本推荐 V3-V4/V4。
扩增子测序数据量如何选择?	通过查找文献找到目标样本所用的数据量, 一般肠道样本建议至少测 5 万条有效序列, 10 万条最佳。
扩增子测序设置多少生物学重复?	后期考虑到统计分析, 一般建议肠道样本每组最少 30 个个体, 鼠模型样本至少 8 个生物学重复, 生物学重复越多越好。
微生物取样有什么注意问题?	一般建议取样器具和收集容器是无菌的; 收集新鲜样品; 采样后 -80 度保存; 切忌反复冻融; 送样时使用干冰运输, 保存和运输时间尽量短。
为什么要收集临床指标信息?	一篇好的微生物文章要把微生物和临床指标真正联系起来, 不但要看组间的群落结构差异, 还要把临床指标和微生物进行相关性分析, 因此要收集尽可能详尽的临床指标信息。

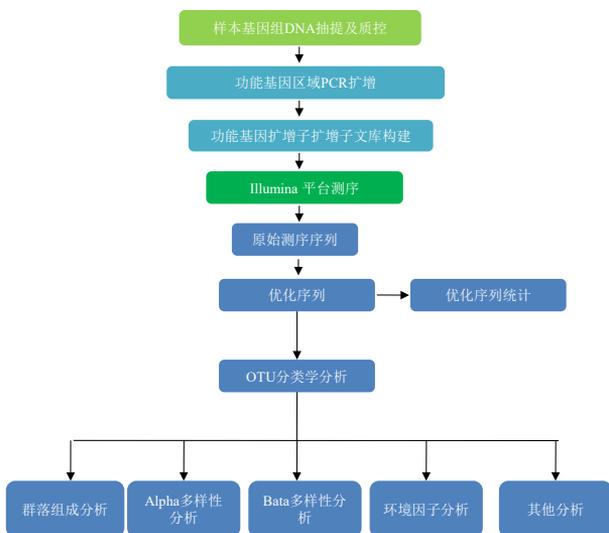
天昊客户部分已发表文章

发表时间	期刊名称	研究内容	影响因子
2020年	Molecular Psychiatry	移植未经药物治疗的精神分裂症患者肠道微生物会导致受体小鼠精神分裂症相关异常行为和犬尿酸代谢失调	11.97
2020年	Food Research International	长期摄入枸杞花青素对机体健康及肠道菌群的影响	3.58
2020年	Journal of Neuroimmunology	视神经脊髓炎频谱疾病患者肠道微生物群失调的横断面研究	2.83
2019年	Current Biology	蚯蚓协调土壤生物群改善多种生态系统功能	9.19
2019年	Environmental Pollution	烯啶虫胺干扰蜜蜂肠道微生物群, 影响代谢稳态和免疫	5.71
2019年	Free Radical Biology and Medicine	黑果枸杞花青素对右旋糖酐硫酸钠导致的结肠炎小鼠的肠道菌群调控及抗炎作用	5.66
2019年	International Journal of Biological Macromolecules	灰树花多糖 (III) 螯合有机铬的降血糖降血脂机制及其对高脂饮食和 STZ 诱导糖尿病小鼠肠道菌群的调节	4.78
2019年	International Journal of Biological Macromolecules	茯砖茶多糖纯化组分对体外厌氧发酵肠道菌群组成和代谢的影响	4.78
2019年	LWT - Food Science and Technology	高纯度蓝莓花色苷的抗氧化活性及其对肠道菌群的影响	3.71
2019年	LWT - Food Science and Technology	人类肠道菌群模拟曲霉胞内和胞外多糖的体外消化和发酵	3.71
2019年	Food Research International	苦丁茶对肠道菌群的调节可改善硫酸葡聚糖诱发的结肠炎	3.58
2019年	BMC Nephrology	原发性肾病综合征患儿初始治疗后肠道菌群组成的变化	2.09
2018年	Molecular Nutrition & Food Research	苦丁茶和茯砖茶可通过调节肠道菌群来预防肥胖	4.32
2018年	International Journal of Biological Macromolecules	模拟唾液、胃和小肠条件下的体外消化及枸杞多糖的人体肠道微生物群发酵	3.91
2018年	Journal of Agricultural and Food Chemistry	茯砖茶多糖通过调节肠道菌群减轻高脂饮食诱导的代谢综合征	3.15
2018年	Journal of Agricultural and Food Chemistry	体外模拟消化和发酵中枸杞蜂花粉多糖对肠道菌群的影响	3.15
2017年	World Journal of Gastroenterology	功能性胃肠病患者的粪便和黏膜菌群与 Toll 样受体 2/4 表达之间的相关性	3.37
2017年	Food & Function	杏鲍菇多糖对粪便微生物组成和免疫应答的影响	3.25
2017年	Journal of Agricultural and Food Chemistry	苦丁茶中二咖啡酰奎宁酸对肠道微生态的调节作用	3.15

微生物功能基因扩增子测序

功能微生物是在自然界中由于其功能的重要性而受到广泛关注的一类微生物，如硝化细菌、反硝化菌、氨氧化细菌、硫酸盐还原菌、固氮菌、固氮菌等。每种功能微生物在分类学上可能有很大不同，但却具有相类似的基因使其能够发挥同样的功能，因此使这些功能细菌发挥这种特定功能的基因就称为功能基因，如 *nxrA*、*nirS/nirK*、*amoA*、*dsrB*、*nifH*。功能基因测序，作为一类特殊的微生物扩增测序项目，是根据复杂环境中具有特殊功能的微生物基因序列设计引物，用该引物进行 PCR 扩增，建库后高通量测序。功能基因测序可有效研究特定环境中的功能微生物物种信息，包括功能微生物物种差异、分类和丰度等，并与每个采样点的环境因子相结合，可以同时分析环境因子与功能细菌群落结构的关系，因此对复杂环境中的微生物构成研究有重要的指导作用。

技术路线



技术优势

- ◆ **数据量大**：不低于 5 万 reads/ 样品，可发现环境微生物群落中新的功能微生物，以及检测痕量功能菌。
- ◆ **准确性**：保证数据的准确性，样品无偏差。
- ◆ **方案灵活多变性**：可根据不同研究目的灵活设计实验方案，解决各类微生物的检测需求。
- ◆ **真实性**：高通量测序，测序结果真实，客观还原菌群结构及丰度比例。

➔ 技术参数

推荐区域	样本要求	测序策略	数据要求
需客户提供（目前已有固氮基因 <i>nifH</i> ，反硝化菌 <i>nirK/nirS</i> ，抗性基因等项目经验，详见下方功能基因列表）。	样品类型：环境 DNA，样本无明显降解； 样品需求量：总量 > 500 ng；浓度 ≥ 20 ng/μL； 纯度：OD260/280 = 1.7-2.0。	Illumina 2×250bp Illumina 2×150bp	每个样本有效序列 ≥ 5 万条， Raw data Q30 数据达到 70% 以上， Clean data Q30 数据达到 80% 以上。

➔ 功能基因列表

类别	基因缩写	蛋白名称
氮循环（固氮作用）	<i>nifH</i>	固氮酶铁蛋白（Nitrogenase iron protein）
氮循环（反硝化作用）	<i>narG</i>	膜结合硝酸盐还原酶（Nitrate reductase alpha subunit）
氮循环（反硝化作用）	<i>nirK</i>	亚硝酸盐还原酶（Copper-containing nitrite reductase）
氮循环（反硝化作用）	<i>nirS</i>	细胞色素 cd1 型亚硝酸还原酶 Nitrite reductase (Cytochrome cd1) (Cytochrome oxidase) (Hydroxylamine reductase)
氮循环（反硝化作用）	<i>norB</i>	一氧化氮还原酶（Nitric oxide reductase subunit B）
氮循环（反硝化作用）	<i>nosZ</i>	一氧化二氮还原酶 Nitrous-oxide reductase (EC 1.7.2.4) (N(2)OR) (N2O reductase)
氮循环（硝化作用）	<i>amoA</i>	氨氧化作用（古菌）
磷循环	<i>phoD</i>	碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase PhoD）
其它	Methane archaea	产甲烷古菌（Methane archaea）
其它	<i>cbbL</i>	固氮：1,5 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因
其它	AMF	丛枝菌根真菌

➔ 天昊客户部分已发表文章

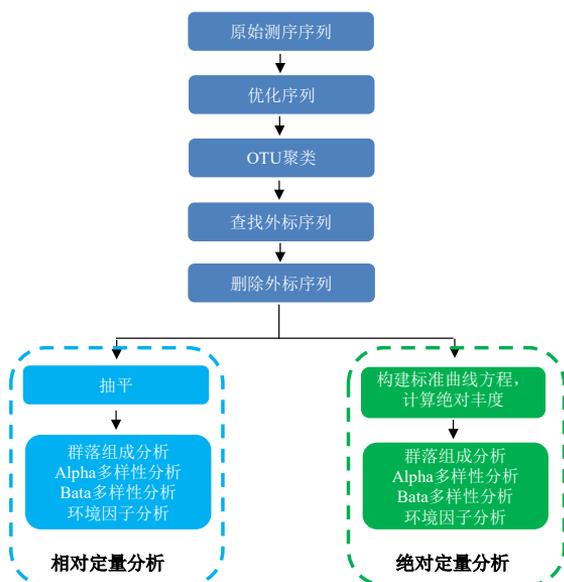
发表时间	期刊名称	研究内容	影响因子
2019年	Soil Biology and Biochemistry	了解长期施加有机物料如何增加土壤磷酸酶活性：针对 <i>phoD</i> 和 <i>phoC</i> 功能性微生物种群的研究	5.6
2017年	Agriculture, Ecosystems and Environment	氮处理后丛枝菌根真菌（AMF）和固氮菌（ <i>nifH</i> ）多样性和群落结构对小麦产量综合影响	4.099
2016年	Frontiers in Microbiology	施肥制度对丛枝菌根真菌（AMF）群落组成的影响与玉米根际土壤中的有机质组成相关	4.165

微生物 16S 扩增子绝对定量测序

16S rRNA 基因扩增子高通量测序，是通过对基因组目的区域进行 PCR 扩增，将目标区域 DNA 扩增富集后进行高通量测序的研究策略，可有效研究特定环境中的物种信息，检测几十至几百种微生物特性。近来，特定环境样本中某一类群微生物的绝对定量问题受到越来越多研究学者的关注，以往都是通过特定物种的 qPCR 绝对定量进行检测，但 qPCR 定量实验结果常常不稳定，且特定物种 qPCR 需要设计特定引物，对引物特异性要求较高，且引物优化难度较大，导致常规的 qPCR 绝对定量实验不再适用于组成较为复杂的环境样本微生物绝对定量。目前，16S rRNA 基因测序手段通过某一 OTU 分类单元的序列数占总序列数的比值来获得相对丰度数据，然而相对丰度信息不能反映环境样本中物种绝对丰度情况。

而基于 16S 外标序列的微生物绝对定量测序恰好能够获得样本中物种的绝对丰度数据。该方法通过向样品 DNA 中添加一定量外标序列，进行 16S 扩增子文库构建、测序，再根据外标序列的 16S 扩增子 reads 数及其绝对拷贝数绘制标准曲线，计算出样品中 OTU 代表序列对应物种 16S rRNA 基因绝对拷贝数。该方法是一种将 qPCR 绝对定量技术和常规 16S 扩增子测序技术合二为一的技术，该技术不但可以进行 Alpha 多样性分析、群落组成分析、Beta 多样性分析和环境因子分析等常规扩增子测序分析，而且可以解析样本中总细菌和特定菌种的绝对拷贝数，该技术充分发挥了“常规 16S 扩增子测序（细菌群落结构）+qPCR（细菌绝对拷贝数）”两种检测技术的各自优势，变‘两张皮’为‘一盘棋’，最大限度地便利了广大微生态研究者。

➡ 技术路线



➡ 技术优势

- ◆ **数据量大：**不低于 15 万 reads/ 样品，可检测环境微生物群落中的痕量菌，以及发现新的微生物。
- ◆ **方案经济便捷：**单个 16S 扩增子测序可同时获得样本中微生物的组成信息和绝对定量数据。
- ◆ **适用范围广：**可同时得到样本中绝大多数优势物种的绝对定量数据，该方法具有普遍适用性。
- ◆ **真实、准确：**绝对定量数据，测序结果真实，客观还原菌群结构及丰度比例，无样品偏差可直接比较。

→ 服务流程



→ 技术参数

测序类型	推荐区域	样本要求	测序策略	数据要求
微生物 16S 扩增子绝对定量测序	V3 V4 V3+V4 V4+V5	样品类型：常规土壤样本和人粪便 DNA，无明显降解； 样品需求量：总量 > 500 ng；浓度 ≥ 20 ng/μL； 纯度：OD260/280 = 1.7-2.0。	Illumina 2×250bp Illumina 2×150bp	每个样本有效序列 ≥ 15 万条；Raw data Q30 数据达到 70% 以上，Clean data Q30 数据达到 80% 以上。

→ 分析内容

标准分析（同时提供绝对定量和相对定量两套分析结果）			
相对定量分析	绝对定量分析	相对定量分析	绝对定量分析
数据质控与统计		Alpha 多样性分析	
有效及优化序列统计	有效及优化序列统计	多样性指数统计	多样性指数统计
OTU 分类分析		多样性指数差异分析	
OTU 聚类分析	OTU 聚类分析	稀释性曲线	稀释性曲线
分类学分析	标准曲线方程及拷贝数计算	Shannon-Wiener 曲线	Rank-Abundance 曲线
物种注释统计	分类学分析	Rank-Abundance 曲线	物种累积曲线
进化树分析	物种注释统计	物种累积曲线	
		Beta 多样性分析	
群落组成分析		Venn 图	Venn 图
单样本物种组成饼图	单样本物种组成饼图	样本聚类树图	样本聚类树图
单样本多级物种组成图	单样本多级物种组成图	PCA & 3D_PCA 分析	PCA & 3D_PCA 分析
分类学系统组成树	分类学系统组成树	PCoA & 3D_PCoA 分析	PCoA & 3D_PCoA 分析
物种总丰度柱状图	物种总丰度柱状图	NMDS & 3D_NMDS 分析	NMDS & 3D_NMDS 分析
丰度分布 Bubble 图	丰度分布 Bubble 图	ADONIS 分析	ADONIS 分析
多样本物种组成柱状图	多样本物种组成柱状图	Lefse 分析	群落构建机制分析 (BetaNTI)
多样本物种组成聚类图	多样本物种组成聚类图	群落构建机制分析 (BetaNTI)	
Heatmap 热图	Heatmap 热图	功能预测分析	
Metastats 分析	ANOVA 方差分析	PICRUSt 功能分析及作图 (PICRUSt)	
ANOVA 方差分析	样本水平拷贝数分析		
	基因拷贝数校正分析		

→ 天昊客户部分已发表文章

发表时间	期刊名称	研究内容	影响因子
2019年	Carbohydrate Polymers	绿刺参岩藻糖基硫酸软骨素的链构象、理化性质及其体外发酵	6.044
2019年	Science of the Total Environment	长期施氮降低了捕食性粘细菌的相对丰度和绝对拷贝数，改变了土壤中粘细菌群落结构	5.589
2019年	Science of the Total Environment	高通量微生物绝对定量测序揭示不同施肥应用对种植番茄的滨海盐渍土壤细菌群落的影响	5.589

SNP 分型

单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种。一个人全基因组内约有 3.6~4.4M 个 SNP, 即平均每 500~1000 个碱基对中就有 1 个。SNP 的数量多、密度大和分布广等特性决定了它非常适合于对复杂性状与疾病的基因定位和连锁分析等方面的研究。现阶段, 更是被广泛用于二代测序检测到的罕见变异的大样本验证。

➡ 天昊多样化 SNP 分型技术

Taqman SNP 分型技术	1 SNP
RFLP 分型 (mf-RFLP)	1~4 SNP
LDR 多重 SNP 分型技术	3-8 plex
Multiplex SNaPshot 多重 SNP 分型技术	8-16 plex
iMLDR [®] 多重 SNP 分型技术	15-30 plex
SNPscan [®] 高通量 SNP 分型技术	48-192 plex
SNPseq [®] 超高通量 SNP 分型技术	300+ plex
GWAS 芯片	650000+ plex

➡ 天昊技术优势

- ◆ 技术平台完美覆盖所有通量 SNP 分型需求。
- ◆ 位点成功率 > 95%; Call rate > 98%; 准确性 > 99.8%。
- ◆ 多种性价比极高的专利技术可选阴性对照、双盲质控、MAF 质控、HWE 质控以及 LD 质控 -- 五重质控保证数据的可靠性和准确性。
- ◆ 专业个性化的课题设计指导, 包括协助进行基因的选择、技术平台的选择、SNP 的选择策略、数据分析的指导, 协助您用最少的经费, 产出最多的成果。

➡ 服务流程



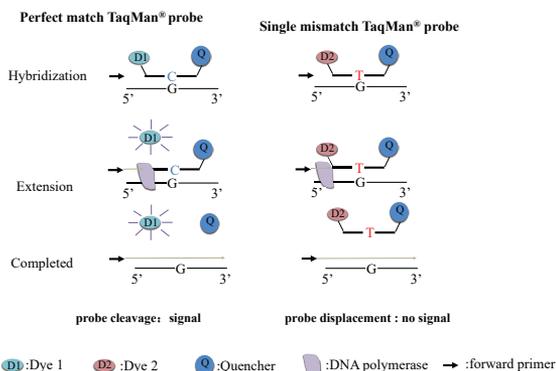
➡ 技术参数

服务类型	样本类	分型结果检测平台	总量 (ng)	浓度 (ng/μL)	分型位点数
Taqman SNP 分型技术	DNA	ABI	≥ 300	≥10 ng/μL	1
RFLP 分型 (mf-RFLP)	DNA	琼脂糖电泳	≥ 300	≥10 ng/μL	1~4
LDR 多重 SNP 分型技术	DNA	毛细管电泳	≥ 300	≥10 ng/μL	3~8
Multiplex SNaPshot 多重 SNP 分型技术	DNA	毛细管电泳	≥ 300	≥10 ng/μL	8~16
iMLDR [®] 多重 SNP 分型技术	DNA	毛细管电泳	≥ 300	≥10 ng/μL	15~30
SNPscan [®] 高通量 SNP 分型技术	DNA	毛细管电泳	≥ 600/48 片段	≥50 ng/μL	48-192
SNPseq [®] 高通量 SNP 分型技术	DNA	二代测序	200+30 ng/20 位点	≥ 20 ng/μL	300+
GWAS 芯片	DNA	芯片	≥ 1μg	≥50 ng/μL	650000+

技术原理

· Taqman SNP 分型技术 (1 plex)

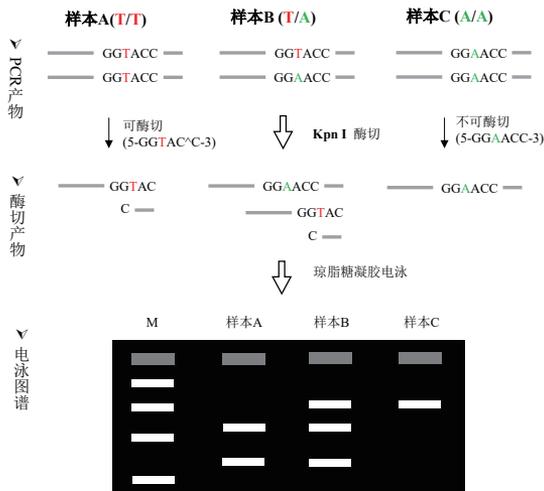
此技术是由美国 Life technologies 公司研发的 SNP 分型技术，其技术原理如下简介。PCR 反应时，加入一对两端有不同荧光标记的特异探针来识别不同的等位基因 (allele1 和 allele2)，5' 端为报告荧光基团 (reporter)，3' 端为淬灭荧光基团 (quencher)。PCR 过程中，两个探针能与正向引物和反向引物之间的互补序列特异退火结合。当探针以完整形式存在时，由于能量共振转移，荧光基团只发出微弱荧光。特异的探针与相应的等位基因杂合后，DNA 聚合酶发挥 5' 到 3' 外切酶活性，把报告荧光基团切割下来，脱离了 3' 端淬灭荧光基团的淬灭作用 (quench)，从而发出荧光。两个探针的 5' 端标有不同的荧光 (FAM 或 VIC)，3' 端标有 MGB 淬灭基团结合体。根据检测到的不同荧光，可以判断相应的样本的 SNP 等位基因型。



Taqman SNP 分型技术示意图

· RFLP SNP 分型技术 (1 plex)

已知的很多 SNP 位点正好位于限制性内切酶的识别区域，我们可以利用限制性内切酶的特殊属性来对一些 SNP 进行分型。有些 SNP 多态位点正好处于限制性内切酶的识别位点处，其中一种多态对应的 PCR 扩增片段能够被相应的内切酶切动，而另一种却不能，因此通过对酶切后的 PCR 产物电泳后的片段长度分析可知检测样本在该位点处的基因型。如果检测 SNP 位点不存在合适的酶切位点，往往可以通过在 PCR 引物 3' 端改变个别碱基引入限制性内切酶酶切位点，通过这种引物修饰法可以实现绝大多数 SNP 位点的分型都能用 RFLP 分析来实现。整个技术的示意图 (以 KpnI 酶切位点 SNP 为例) 如下：

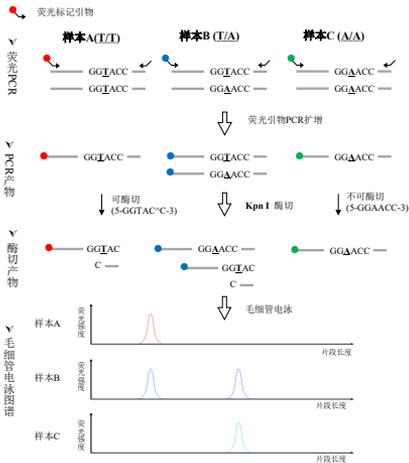


RFLP SNP 分型技术示意图

➡ 技术原理

· 多重荧光 RFLP SNP 分型技术 (2-4 plex)

此技术的基本原理与 RFLP SNP 分型技术相同。区别在于，我们利用荧光标记 PCR 引物，通过毛细管电泳来精确区分酶切片段大小，从而实现了多样本的多重酶切，增加了通量，大大降低了检测成本。

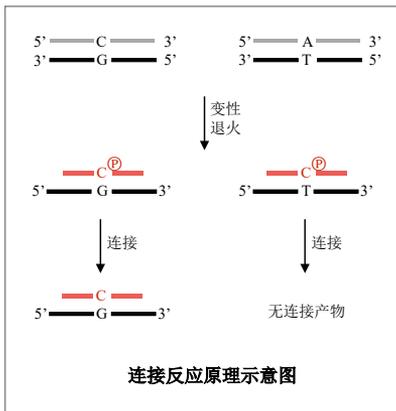


多重荧光 RFLP SNP 分型技术示意图

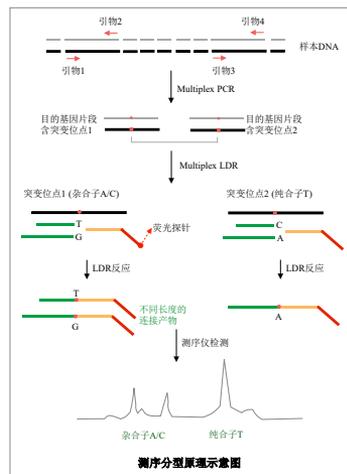
· LDR 多重 SNP 分型技术 (3-8 plex)

连接酶检测反应 (Ligase Detection Reaction, LDR) 是利用高温连接酶实现对基因多态性位点的识别。高温连接酶一旦检测到 DNA 与互补的两条寡聚核苷酸接头对应处存在着基因点突变类型的碱基错配，连接反应就不能进行。

如下左图：右边的探针与模板有一个碱基不配对，所以连接反应不能进行，没有连接产物；左边的探针与模板 DNA 完全互补，故进行连接反应。通过温控循环该特异性连接反应可反复进行，达到线性扩增的效果。当检测到 DNA 与互补的两条寡聚核苷酸接头对应处存在着碱基错配，则连接反应就不能进行。在同时存在着荧光标记的探针时，由于前者与模板 DNA 互补，故它与下游探针的连接反应得以进行，而后者则无法与下游探针连接。在连接反应结束后进行测序仪检测，检测到的结果即为 G，从而可认定该 SNP 位点为 G。LDR 检测方法利用长度差异可以将多重 LDR 产物在 ABI 测序系统中进行检测，实现一次检测多个 SNP 位点。



LDR 分型技术示意图

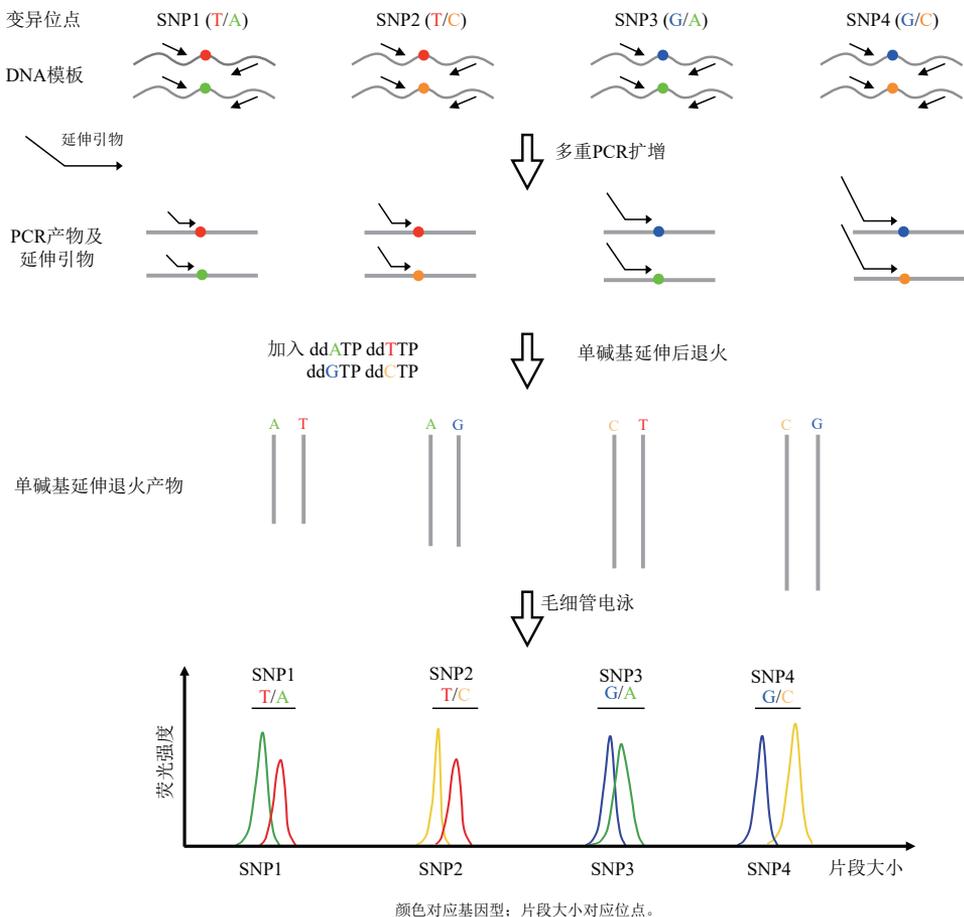


测序分型原理示意图

技术原理

· Multiplex SNaPshot 多重 SNP 分型技术 (8-16 plex)

利用美国 Life Technologies 公司开发的 SNaPshot 技术，针对中等通量的 SNP 分型项目进行了技术上的改进大大提高了分型的通量和准确性。SNaPshot 又称为小测序技术，是在一个含有测序酶，四种荧光标记的 ddNTP，紧挨多态位点 5' 端的不同长度延伸引物和 PCR 产物模板的反应体系中，引物延伸一个碱基即终止，经 ABI 测序仪跑胶后，根据峰的颜色可知掺入的碱基种类，从而确定该样本的基因型。通过针对不同的 SNP 位点设计不同长度的延伸引物来做到多个 SNP 在一个反应体系中进行分型，目前已经可以做到 15 个位点同时分型的通量。由于此方法为四色荧光标记，所以可以针对各种 SNP 类型进行分型，同时还可以对插入、缺失进行分析。

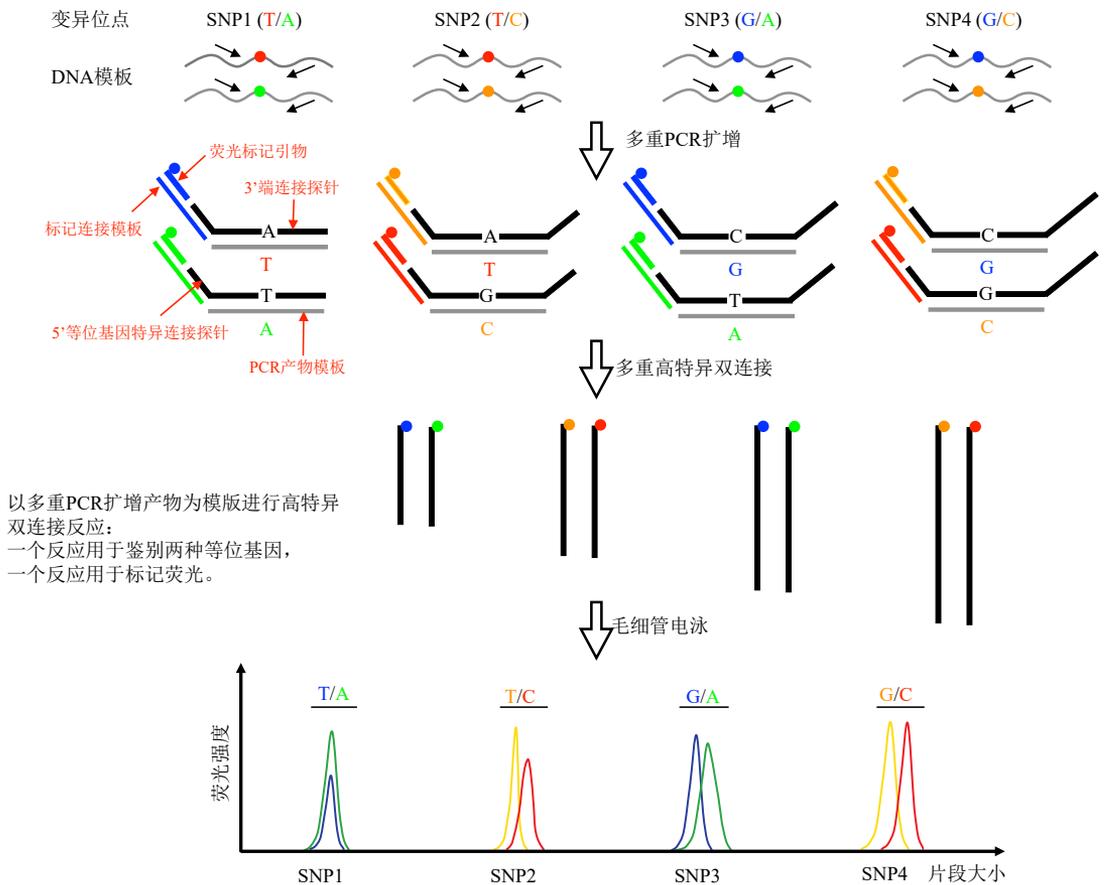


Multiplex SNaPshot 多重 SNP 分型技术示意图

技术原理

· iMLDR[®] 多重 SNP 分型技术 (15-30 plex)

iMLDR[®] 技术是基于传统的连接酶反应经过改进后的具有自主知识产权的多重 SNP 分型技术，相比于传统的连接酶反应技术，iMLDR 提高了准确性和分型的成功率，经过重复实验和双盲样本的初步验证，该技术的数据准确性超过 98%，仅次于测序和 SNaPshot。

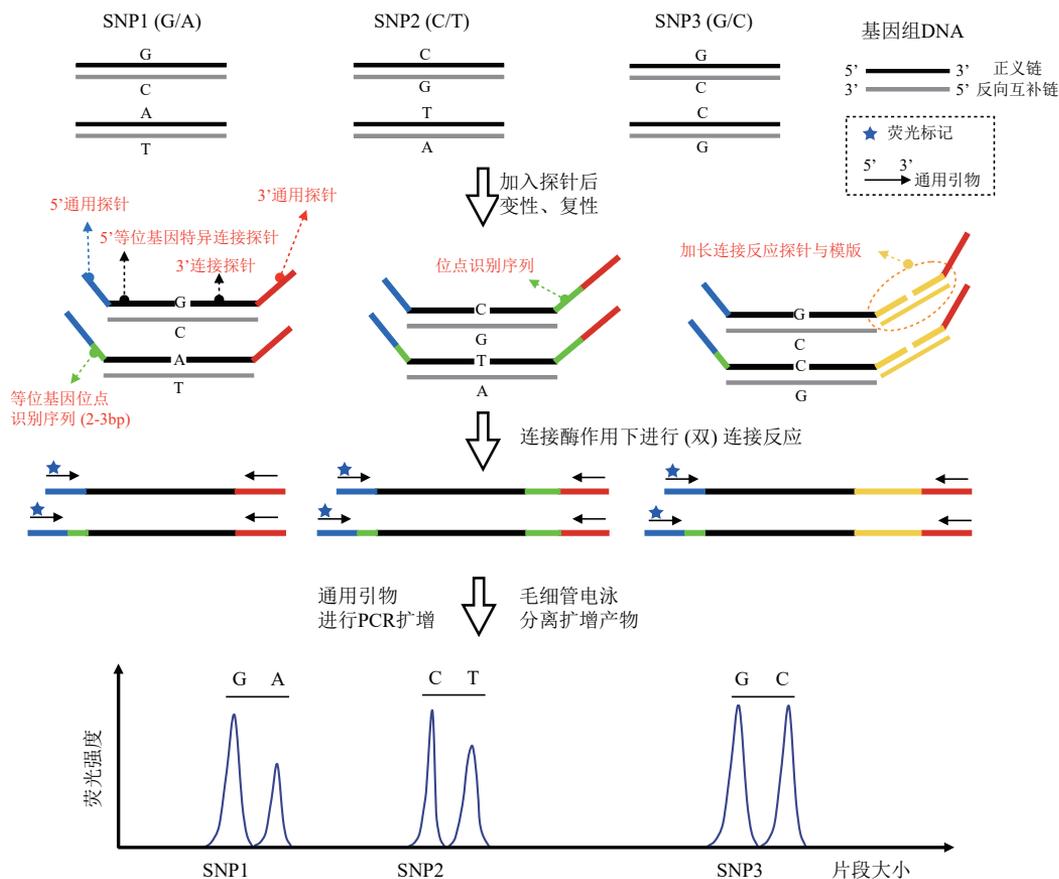


iMLDR[®] 多重 SNP 分型技术示意图

技术原理

· SNPscan[®] 高通量 SNP 分型技术 (48/96/144/192 plex)

SNPscan[®] 是由上海天昊生物科技有限公司自主开发的多重 SNP 分型专利技术，能在一个检测流程中同时实现对 48/96/144/192 个 SNP 位点进行分型。该技术基本原理是采用连接酶连接反应的高特异性实现对 SNP 位点等位基因的识别，然后通过连接酶连接反应的高特异性实现对 SNP 位点等位基因的识别，然后在连接探针末段引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶连接反应获得位点对应的不同长度连接产物，利用标记荧光的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增，通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离，最后通过对 GeneMapper 软件分析获取各个 SNP 位点的基因型。

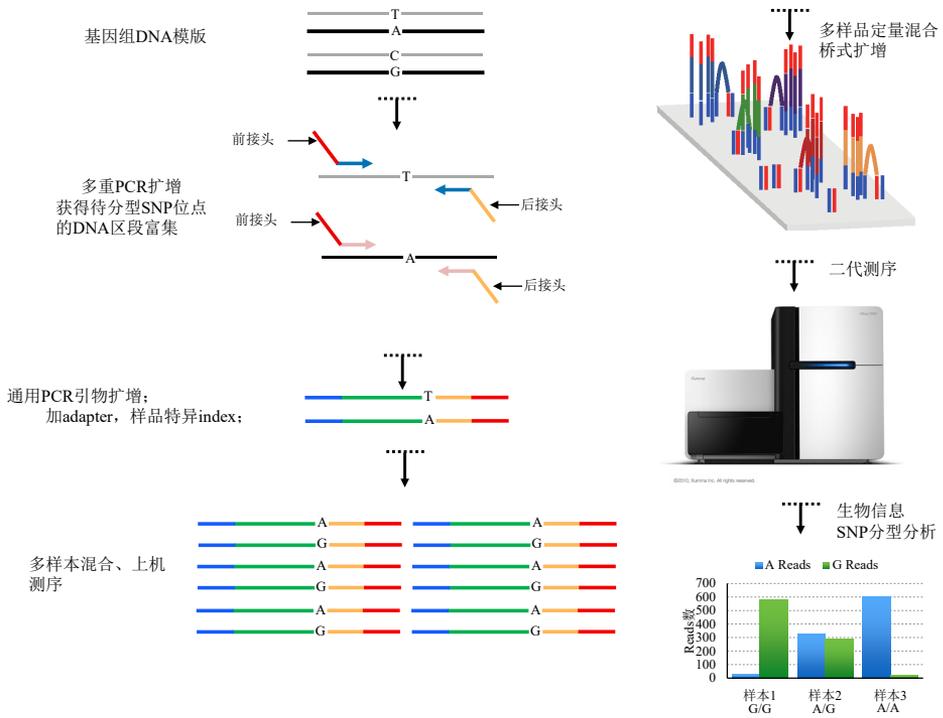


SNPscan[®] 高通量 SNP 分型技术示意图

➔ 技术原理

· SNPseq[®] 超高通量 SNP 分型技术

SNPseq[®] 是由上海天昊生物科技有限公司自主开发的多重 SNP 分型专利技术。该技术能在一个检测流程中同时实现 300 至数千个 SNP 位点进行分型。该技术基本原理是采用多重 PCR 对包含有待分型 SNP 位点的 DNA 区段富集，通过通用引物 PCR 扩增构建二代测序上样文库，最后通过高通量测序 (500~1000×)，结合二代测序数据分析获取各个 SNP 位点的基因型。



SNPseq[®] 超高通量 SNP 分型技术示意图

➔ 技术原理

· GWAS 芯片分型技术 (>65 万个 SNP)

Infinium Global Screening Array-24 (GSA) 3.0 版本芯片是 illumina 推出的覆盖全球人种的一款高效，高质量且性价比极高的基因分型芯片，共包含超过 65 万个探针，可以为群体遗传学研究、变异筛查和精准医学研究提供一种“低成本，大规模”的解决方案。利用成熟的 iScan 系统、一体化的分析软件以及 Infinium 高通量筛查 (HTS) 分析，这款 24 个样本的高密度 BeadChip 芯片提供了针对广泛应用而优化的 SNP 覆盖，并一如既往地带来了 Illumina 基因分型芯片所拥有的高质量且可重复的数据。GSA 试剂盒包括 BeadChip 芯片和试剂的便利包装，可利用经过简化的高通量 Infinium 流程来扩增、片段化、杂交、标记并检测遗传变异。

Infinium Global Screening Array-24 (GSA) 2.0 版本芯片产品信息

Table 2: Product information

Feature	Description
Species	Human
Total number of markers	665,608
Capacity for custom bead types	50,000
Number of samples per BeadChip	24
DNA input requirement	200 ng
Assay chemistry	Infinium HTS
Instrument support	iScan or HiScan™ System
Sample throughput ^a	~ 2304 samples/week
Scan time per sample	iScan System HiScan System 2.5 min 2.0 min

a. Estimate assumes 1 iScan System, 1 AutoLoader, 2 Tecan robots, and a 5-day work week.

Infinium Asian Screening Array-24 v1.0 芯片是 illumina 推出的针对东亚人群的一款高效，高质量且性价比极高的基因分型芯片，可以为东亚人群的群体遗传学研究、变异筛查和精准医学研究提供一种“低成本，大规模”的解决方案。

Infinium Asian Screening Array-24 v1.0 芯片产品信息

Table 1: Product information

Feature	Description
Species	Human
Total number of markers	654,027
Capacity for custom bead types	50,000
Number of samples per BeadChip	24
DNA input requirement	200 ng gDNA
Assay chemistry	Infinium HTS
Instrument support	iScan System
Maximum iScan System sample throughput ^a	~ 5760 samples/week
Scan time per sample	1.3 min

a. Approximate values, scan times, and maximum throughput may vary depending on laboratory and system configurations.

Infinium OmniZhongHua-8 BeadChip 出色覆盖全基因组关联研究 (GWAS) 在 中国人种中 发现的常见、中等和罕见变异。经优化的标签 SNP 是从 HapMap 的三个阶段和千人基因组计划 (1kGP) 中精心挑选, 可生成侧重于群体的阵列, 以揭示中国人种中疾病与性状的新关联。

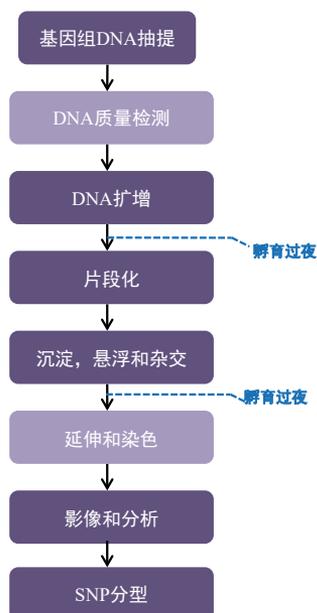
Infinium OmniZhongHua-8 BeadChip 可对每个样本的超过 890,000 个标记进行图谱分析。该实验分析方法采用 Illumina 专有的 BeadArray 技术, 能够提供极高质量的数据, 实现高检出率 (平均 > 99%)、高重现性 (> 99.9%) 和低样本重复率。信噪比高而整体噪音水平低, 有助于进行精确、可靠的检出和拷贝数分析。

Infinium OmniZhongHua-8 v1.4 芯片产品信息

Table 1: Product information

Feature	Description
Species	Human
Total number of markers	1,175,489
Number of samples per BeadChip	8 Samples
DNA input requirement	200 ng
Assay chemistry	Infinium HD Super
Instrument support	iScan or HiScan System
Sample throughput ^a	~ 960 samples/week
Scan time per sample	iScan System HiScan System ~7.5 min ~7.5 min

➔ 技术路线



➔ 技术参数

样品类型	完整无污染的人类基因组 DNA。
样品质量	OD260/280 值在 1.8~2.0 之间, 浓度 ≥50ng/μl。
样品需求量	总量 ≥1μg
样品保存	DNA 样品可 -20°C 短期保存 或者 -80°C 长期保存。避免 反复冻融。

· 天昊客户部分已发表文章

文章	技术平台	合作单位
Polymorphisms in Toll-Like Receptor 10 and Tuberculosis Susceptibility: Evidence from Three Independent Series, <i>Frontiers in Immunology</i> , 2018, IF:5.511.	SNPscan®	四川大学华西医院
A novel variant associated with HDL-C levels by modifying DAGLB expression levels: An annotation-based genome-wide association study, <i>European Journal of Human Genetics</i> , 2018, IF:3.636.	SNPscan®	浙江大学
The distribution of three candidate cold-resistant SNPs in six minorities in North China, <i>BMC Genomics</i> , 2018, IF:3.73.	SNPscan®	哈尔滨医科大学
Oligoadenylate synthetase 3 S381R gene polymorphism is associated with severity of EV71 infection in Chinese children, <i>Journal of Clinical Virology</i> , 2018, IF:3.101.	iMLDR®	青岛大学附属医院
Association between the PPP1R3B polymorphisms and serum lipid traits, the risk of coronary artery disease and ischemic stroke in a southern Chinese Han population, <i>Nutrition & Metabolism</i> , 2018, IF:3.483.	SNaPshot	广西医学院第一附属医院
Antituberculosis Drug-Induced Adverse Events in the Liver, Kidneys, and Blood: Clinical Profiles and Pharmacogenetic Predictors, <i>Clinical Pharmacology & Therapeutics</i> , 2018, IF:6.544.	SNPscan®	四川大学华西医院
SORL1 is associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease: A replication study and meta-analyses, <i>Molecular Neurobiology</i> , 2017, IF:5.076.	iMLDR®	青岛市市立医院
Long non-coding RNA H19 induces cerebral ischemia reperfusion injury via activation of autophagy, <i>Aging and Disease</i> , 2017, IF:5.058.	iMLDR®	盛京医院
Susceptibility loci for metabolic syndrome and metabolic components identified in Han Chinese: a multi - stage genome - wide association study, <i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i> , 2017,	SNPscan®	浙江大学
Gene Polymorphisms for Both Auto-antigen and Immune-Modulating Proteins Are Associated with the Susceptibility of Autoimmune Myasthenia Gravis, <i>Molecular Neurobiology</i> , 2017, IF:5.076.	SNPscan®	山东大学齐鲁医院
No association of PARK10 polymorphism with Parkinson's disease in Han Chinese population, <i>Parkinsonism & Related Disorders</i> , 2017, IF:4.721.	SNPscan®	四川大学华西医院
Association of leptin and leptin receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population, <i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i> , 2017, 4.302.	iMLDR®	安徽医科大学
TREM1 facilitates microglial phagocytosis of amyloid beta, <i>Acta Neuropathologica</i> , 2016, IF:15.872.	iMLDR®	南京医科大学附属南京第一医院
Association of CD40 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders, <i>Molecular Neurobiology</i> , 2016, IF:5.076.	iMLDR®	四川大学华西医院

CNV 分型

基因组拷贝数变异 (Copy Number Variation, CNV) 是指与基因组参考序列相比, 基因组中 $\geq 1\text{kb}$ 的 DNA 片段插入、缺失、扩增, 及其互相组合衍生出的复杂变异。由于其具有分布范围广、可遗传、相对稳定和高度异质性等特点, 目前认为, CNV 是一种新的可以作为疾病易感标志的基因组 DNA 多态性, 其变异引起的基因剂量改变可以导致表型改变。

➡ 天昊多样化 CNV 分型技术

定量 PCR 检测拷贝数	1plex
AccuCopy [®] 多重 DNA 拷贝数检测技术	12-16plex
CNVplex [®] 高通量 DNA 拷贝数检测技术	48-96plex
CNVseq [®] 超高通量 DNA 拷贝数检测技术	500-2000plex
低深度全基因组测序	全基因组

➡ 天昊技术优势

- ◆ 技术平台完美覆盖所有通量 CNV 分型需求
- ◆ 专利技术见刊 Nature
- ◆ 多内参质控保证数据的可靠性和准确性
- ◆ 专业个性化的课题设计指导, 包括协助进行基因的选择、技术平台的选择、CNV 频率查询等; 协助您用最少的经费, 产出最多的成果。

➡ 服务流程



➡ 技术参数

服务类型	样本类型	分型结果检测平台	总量 (ng)	浓度 (ng/ μL)	分型位点数
定量 PCR 检测拷贝数	DNA	荧光定量 PCR 仪	$\geq 300/$ 片段	≥ 20 ng/ μL	1 plex
AccuCopy [®] 多重 DNA 拷贝数检测技术	DNA	毛细管电泳	$\geq 500\text{ng}$	≥ 20 ng/ μL	12-16 plex
CNVplex [®] 高通量 DNA 拷贝数检测技术	DNA	毛细管电泳	$\geq 600/48$ 片段	≥ 20 ng/ μL	48-96 plex
CNVseq [®] 超高通量 DNA 拷贝数检测技术	DNA	二代测序		≥ 20 ng/ μL	500-2000 plex
低深度全基因组测序	DNA	二代测序		≥ 10 ng/ μL	全基因组

技术原理

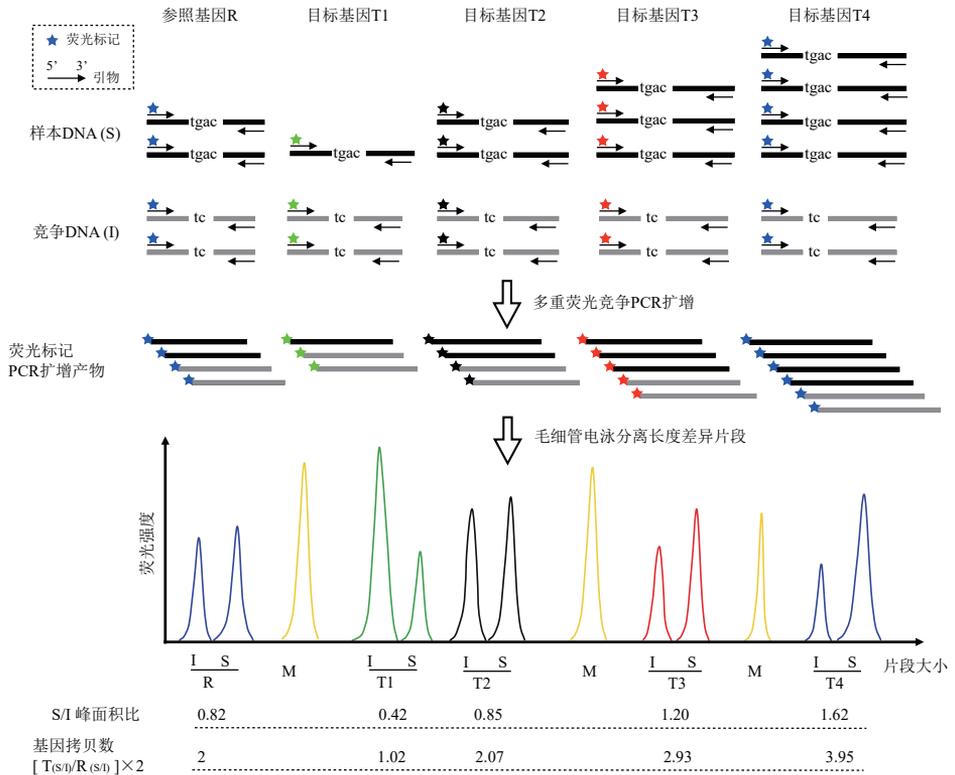
· 荧光定量 PCR 检测

荧光实时定量 PCR 检测技术作为较早出现的检测目的区段 DNA 拷贝数的方法，主要可以通过检测 PCR 反应体系中的荧光强度来实现对初始样品的某个 DNA 片段的拷贝数进行定量。最为常用的方法是通过 SYBR Green 嵌入 DNA 双链发光原理来实现对 DNA 的定量，然后运用已知为 2 拷贝的 DNA 标准品作为内参校正，从而对目的 DNA 片段的拷贝数进行确认。

技术原理

· AccuCopy[®] 多重 DNA 拷贝数检测技术 (12-16 plex)

上海天昊生物科技有限公司开发的 AccuCopy[®] 多重 DNA 拷贝数检测技术（专利号：201010180551.2），根据客户项目要求合成特异引物和竞争模板，以及优化 PCR 反应体系后组装而成。该专利技术原理说明见下图。取一定量的竞争 DNA 片段混合物——每个片段与各自对应基因片段仅有微小差别（通常为几个碱基长度差异），然后与合适量的样本 DNA 混合，作为随后多重荧光竞争性 PCR 扩增的模板；多重 PCR 产物经毛细管电泳后对不同基因位点扩增产物以及同一位点的不同模板（样本 DNA 与竞争 DNA）扩增产物根据其长度差异进行分离；分析每个基因片段的 S/I 值，利用参照基因 S/I 值对目标基因 S/I 值进行校正后获取目标基因的准确拷贝数。与其它拷贝数检测技术如 qRT-PCR 和 MLPA 相比，该检测专利技术具备低成本、高效率、高准确性的优势。PCR 扩增产物用 ABI3130XL 进行毛细管电泳，原始数据文件采用 GeneMapper4.0 (Life technologies) 进行目标峰高及峰面积数据读取，输出数据采用 EXCEL 进行处理分析。



AccuCopy[®] 多重 DNA 拷贝数检测技术示意图

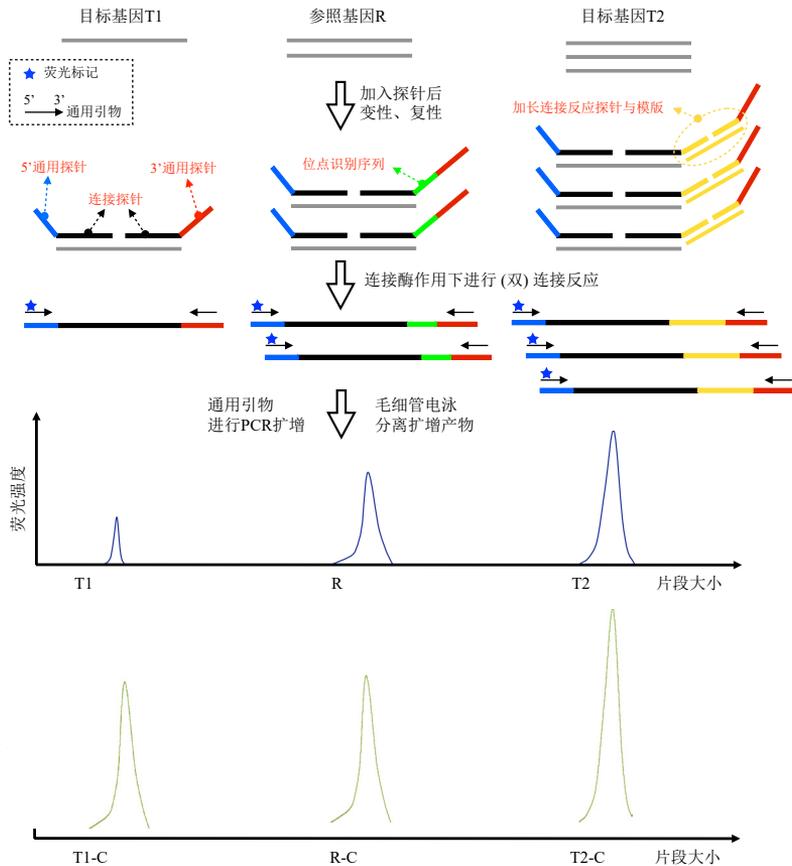
➔ 技术原理

· CNVplex[®] 高通量 DNA 拷贝数检测技术 (48-96 plex)

CNVplex[®] 采用连接酶高特异性连接反应对目的区域进行杂交、连接，通过专利技术在连接探针末段引入不同长度的标签序列获得长度各异的目的探针连接产物，利用荧光标记的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增，通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离检测，最后通过对电泳图谱的分析获取各个位点的峰高，进而对样品目的区域的拷贝数进行分析确定。

拷贝数计算：

- 输出每个峰高数值 (H 值)，如图中 H(T1), H(R), H(T2)
- 计算各个目标区峰相对参照峰的比值 (R 值)，如 $R(T1) = H(T1)/H(R)$
- 将检测样本的各个目标区 R 值除以对照样本的相应目标区 R 值 (RR 值) 再乘以对照样本该目标区的拷贝数 (通常为 2) 即获得检测样本各个目标区的拷贝数，如检测样本 $RR(T1) = 0.5$ ，但如果对照样本 $RR(T1) = 1$ ，而 T1 在对照样本中的拷贝数为 2，则检测样本本数 T1 的拷贝数为 $0.5/1 \times 2 = 1$ 。

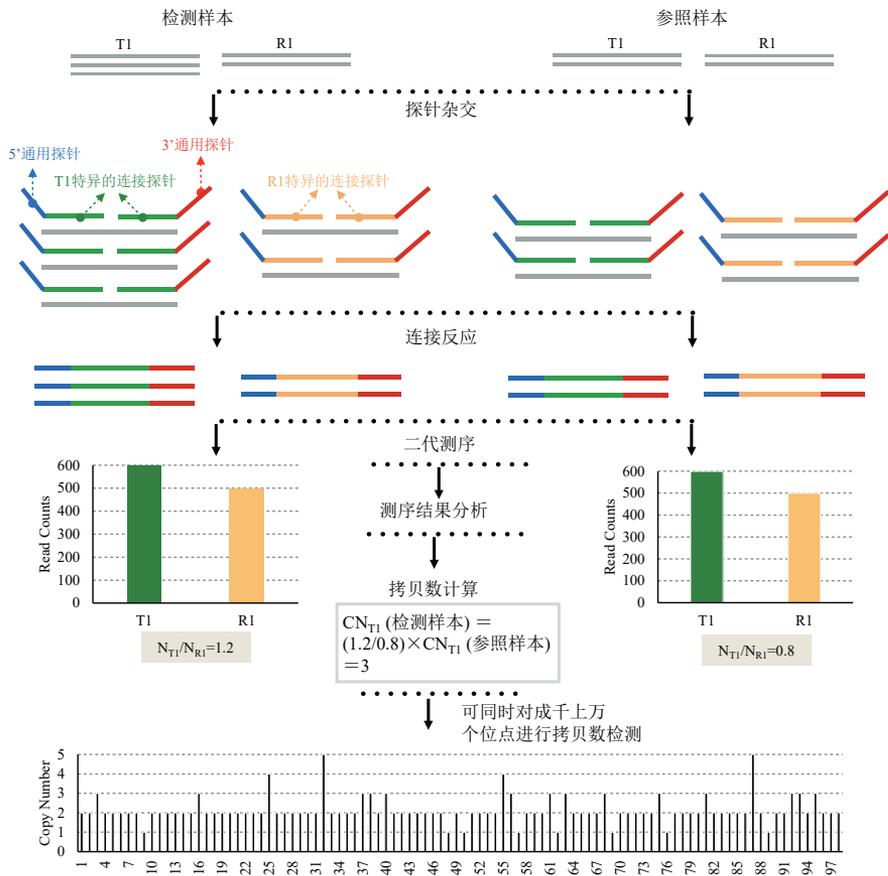


CNVplex[®] 高通量 DNA 拷贝数检测技术示意图

技术原理

· CNVseq[®] 超高通量 DNA 拷贝数检测技术 (500-2000 plex)

CNVseq[®] 采用连接酶高特异性连接反应对目的区域进行杂交、连接，获得大量不同的目的探针连接产物，利用通用引物对连接产物进行 PCR 扩增后利用二代测序技术进行高通量测序，最后利用生物信息学分析对测序结果进行深度分析，进而确定样品中目的区域的拷贝数。



图例：
T1: 目标基因1, R1: 参照基因1, N: 检测Reads数, CN: 拷贝数

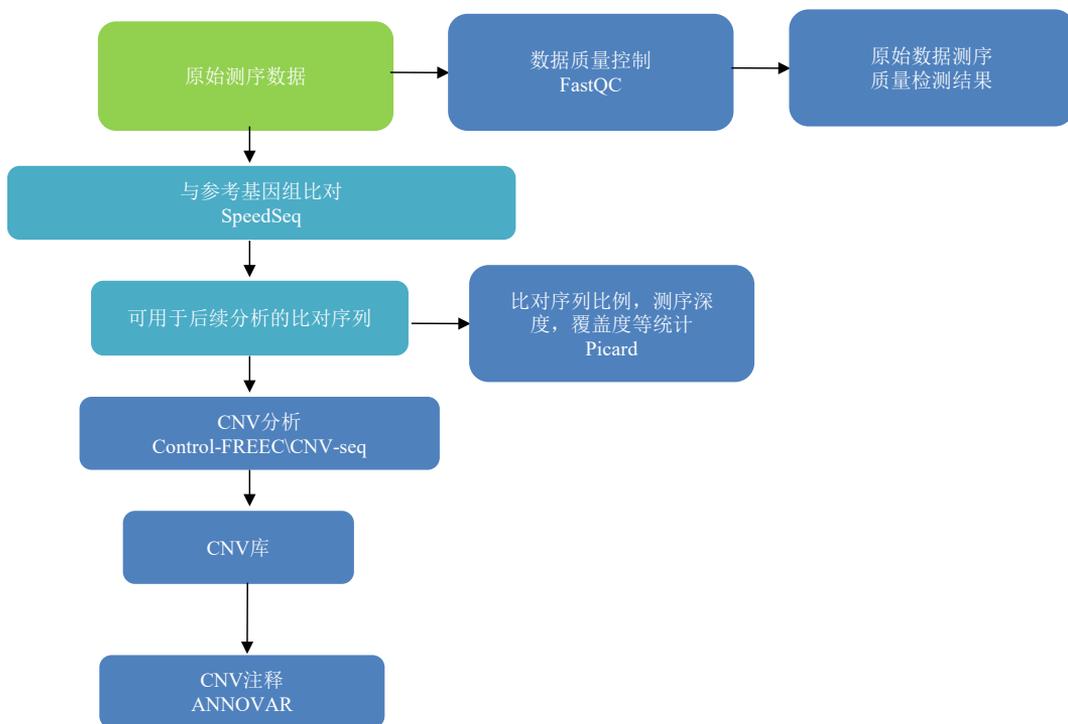
CNVseq[®] 超高通量 DNA 拷贝数检测技术示意图

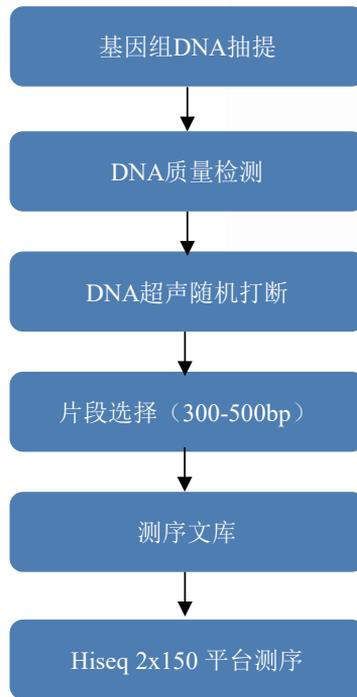
⇒ 技术原理

· 低深度全基因组测序

CNV 是人类基因多样性的重要组成部分。大部分的 CNV 大小在 1Kb 以内到几 Kb，在普通人群中的变异频率 >1%。而一些较大片段的 CNV（大于 100 Kb）则相对少见，但这些 CNV 却与人类疾病紧密相关，往往会引发生缺陷、神经精神疾病、癌症等。因此，拥有可靠的、准确的 CNV 检测及分析技术在临床诊断及科学研究中尤为重要的。高深度的双端全基因组测序对 CNV 检测具有高敏感度及分辨率。然而，高深度 WGS (>30x) 的花费很高，且试验周期比较长，同时其对计算机的硬性条件及分析人员的要求也比较高。近年的研究发现，利用低深度的全基因组测序技术（1X-5X）去检测较大片段 CNV，性价比更高【Zhou B, Ho S S, Zhang X, et al. Whole-genome sequencing analysis of CNV using low-coverage and paired-end strategies is efficient and outperforms array-based CNV analysis[J]. Journal of medical genetics, 2018, 55(11): 735-743.】。

⇒ 技术及分析路线





· 天昊客户部分已发表文章

文章	技术平台	合作单位
YTHDF1 Regulates Tumorigenicity and Cancer Stem Cell-Like Activity in Human Colorectal Carcinoma, <i>Frontiers in Oncology</i> , 2019	Accucopy®	中南大学湘雅三医院
Copy number variations and polymorphisms in HSP90AB1 and risk of systemic lupus erythematosus and efficacy of glucocorticoids, <i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i> , 2019	Accucopy®	安徽医科大学
Identification of a complex genomic rearrangement in TMPRSS3 by massively parallel sequencing in Chinese cases with prelingual hearing loss, <i>Molecular genetics and Genomic Medicine</i> , 2019	CNVplex®	陆军军医大学
The characteristics and spectrum of F9 mutations in Chinese sporadic haemophilia B pedigrees, <i>Haemophilia</i> , 2019	Accucopy®	瑞金医院
Colonic Lysine Homocysteinylation Induced by High-Fat Diet Suppresses DNA Damage Repair, <i>Cell Reports</i> , 2018	Accucopy®	复旦大学附属妇产科医院
Genome-wide definition of selective sweeps reveals molecular evidence of trait-driven domestication among elite goat (<i>Capra</i> species) breeds for the production of dairy, cashmere, and meat, <i>GigaScience</i> , 2018	Accucopy®	西安交通大学
Downregulation of ZC3H14 driven by chromosome 14q31 deletion promotes hepatocellular carcinoma progression by activating integrin signaling, <i>Carcinogenesis</i> , 2018	CNVplex®	广西医科大学附属肿瘤医院
Low responsiveness to a hepatitis B virus vaccine in a Chinese population lacks association with ITGAL, CD58, TNFSF15, CCL15, TGFB3, and BCL6 gene variants, <i>Infection, Genetics and Evolution</i> , 2018	Accucopy®	广东医科大学
Copy number variation in SOX6 contributes to chicken muscle development, <i>Genes</i> , 2018	CNVplex® Accucopy®	广东省农业动物基因组学和分子育种重点
16p11.2 deletion in patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesia but without intellectual disability, <i>Brain and Behavior</i> , 2018	Accucopy®	广州医科大学附属第二医院

文 章	技术平台	合作单位
Germline Duplication of SNORA18L5 Increases Risk for HBV-related Hepatocellular Carcinoma by Altering Localization of Ribosomal Proteins and Decreasing Levels of p53, <i>Gastroenterology</i> , 2018, IF:20.773.	CNVplex®	蛋白质组学国家重点实验室
Spectrum and origin of mutations in sporadic cases of haemophilia A in China, <i>Haemophilia</i> , 2018, IF:2.768.	AccuCopy®	上海交通大学
CNVcaller: Highly Efficient and Widely Applicable Software for Detecting Copy Number Variations in Large Populations, 2017, <i>Gigascience</i> , IF:7.267.	CNVplex®	西北农林科技大学
Complex recombination with deletion in the F8 and duplication in the TMLHE mediated by int22h copies during early embryogenesis, <i>Thrombosis and Haemostasis</i> , 2017, IF:4.952.	AccuCopy®	瑞金医院
Molecular and clinical profile of VWD in a large cohort of Chinese population: application of next generation sequencing and CNVplex® technique, <i>Thrombosis and Haemostasis</i> , 2017, IF:4.952.	CNVplex®	瑞金医院
Association between TLR7 copy number variations and hepatitis B virus infection outcome in Chinese, <i>World Journal of Gastroenterology</i> , 2017, IF:3.3.	AccuCopy®	安徽医科大学第二附属医院
Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2, <i>Nature</i> , 2016, IF:41.577.	AccuCopy®	中科院；复旦大学； 复旦大学附属儿科医院
Analysis copy number variation of Chinese children in early-onset epileptic encephalopathies with unknown cause, <i>Clinical Genetics</i> , 2016, IF:3.512.	CNVplex®	中南大学湘雅医院
Copy Number Variation of HLA-DQA1 and APOBEC3A/3B Contribute to the Susceptibility of Systemic Sclerosis in the Chinese Han Population, <i>Journal of Rheumatology</i> , 2016, IF:3.47.	AccuCopy®	复旦大学
Evaluation and comparison of three assays for molecular detection of spinal muscular atrophy, <i>Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i> , 2016, IF:3.556.	CNVplex®	南方医科大学
AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A, <i>Clinica Chimica Acta</i> , 2016, IF:2.926.	AccuCopy®	瑞金医院
Genomic variations of the mevalonate pathway in porokeratosis, <i>Elife</i> , 2015, IF:7.616.	CNVplex®	复旦大学附属华山医院； 天昊基因科技（苏州）
Genetic variations of IL17F and IL23A show associations with Behçet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, <i>Ophthalmology</i> , 2015, IF:7.479.	AccuCopy®	重庆医科大学
Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma, <i>Journal of Experimental & Clinical Cancer Research</i> , 2015, IF:6.217.	AccuCopy®	西南医院；第三军医大学

全国分布图



合作伙伴评价

复旦大学生命科学学院：

检测质量很好，检测速度很快，报告也很规范，解决问题能力也很好！

同济大学医学院：

天昊生物检测周期短，结果好，符合实验要求，能为我们提供良好的科研思路。

南京医科大学公共卫生学院：

总体水平在同行中比较突出！

山东省皮肤病性病防治研究所：

天昊生物二代测序质量很好！

部分合作单位

黑龙江		哈尔滨医科大学附属第二医院
辽宁		大连医科大学
		大连大学附属中山医院
北京		北京协和医院
		中国医学科学院阜外心血管病医院
		首都儿科研究所
		北京大学第六医院
		中国人民解放军军事医学科学院
天津		天津医科大学
山东		山东省立医院
		青岛市市立医院
		山东大学齐鲁医院
河南		郑州大学
安徽		安徽医科大学
江苏		南京医科大学
		南京大学医学院
		南京军区南京总医院
上海		复旦大学
		上海长征医院
		复旦大学附属中山医院
		复旦大学附属华山医院

浙 江		浙江大学
		浙江大学医学院附属第一医院
		浙江大学医学院附属第二医院
		浙江省肿瘤医院
福 建		福建省肿瘤医院
		福建医科大学附属第一医院
		福建医科大学附属协和医院
广 西		广西医科大学
广 东		中山大学
		广州医科大学
		南方医科大学
湖 南		中南大学湘雅医院
云 南		昆明医科大学
四 川		四川大学华西医院
		四川大学
		中国科学院成都生物研究所
重 庆		中国人民解放军第三军医大学
		西南医院
		重庆医科大学
西 藏		西藏民族大学
新 疆		新疆医科大学第一附属医院
陕 西		西安交通大学
		陕西师范大学



上海天昊生物科技有限公司

www.geneskybiotech.com

地址：上海市浦东新区康桥路787号9号楼

电话：400-065-6886

传真：021-50802059