

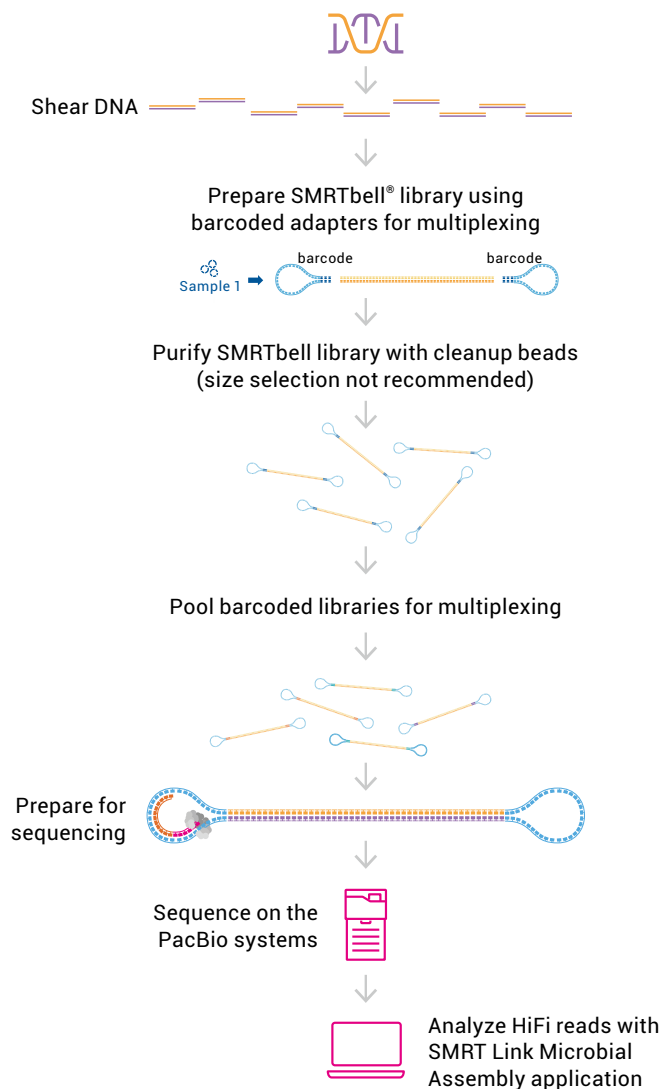
微生物全基因體定序

應用範例

以 PacBio 高精準長讀取定序技術【**HiFi Sequencing**】進行**微生物全基因體定序** (Microbial whole genome sequencing)，能克服傳統難以定序的高重複序列區域、GC-rich 區域，較其它定序平台更輕易組裝出完整的染色體與質體，幫助科研人員獲得細菌 SNPs、大片段基因結構變異等全面性資訊，以深入探討微生物基本生理、多重抗藥性基因背景與抗藥性可能傳播機制…等問題。

From genomic DNA to complete genome in a single experiment

HiFi 實驗流程



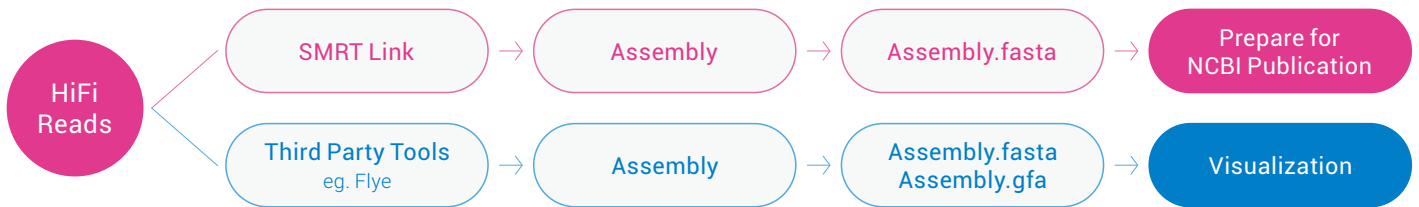
注意事項與建議

- 建議樣本量：1 µg 高品質高分子量 DNA (推薦使用 Circulomics CBB nanobind kit 萃取微生物 HMW DNA)
- 建議將樣本 DNA 碎裂成 7-10 kb 片段長度，以達到最佳 PacBio HiFi 定序效率
- 單片 SMRT Cell 可同時定序多至 96 個樣本，或總計約 375 Mb 的基因體資訊，足夠將大多數微生物組裝成單一 Contig
- 使用 PacBio 免費軟體 SMRT Link 隨附的 Microbial multiplexing calculator，可簡化多樣本的等莫耳參數計算工作
- SMRT Link v11 支援下機後數據的 De-multiplexing、組裝、環化等流程，可產出高品質的染色體與質體
- 下機 CCS 數據準確度可達 >99.99%
- 下機檔案格式可為 BAM, FASTA/Q 標準格式，能無縫連接其它下游分析工具

生資分析流程請見背頁

微生物組裝的生資分析流程

PacBio HiFi Reads 可直接使用 SMRT Link 軟體進行微生物組裝分析，並輸出完整組裝結果，檔案可直接上傳至 NCBI 進行發表；亦可選擇使用第三方組裝工具進行分析 (例如：Flye)，並將最終組裝結果進行視覺化呈現。



單獨使用 HiFi Reads 即可組裝出微生物完整的染色體與質體

克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的基因體大約 5.4 Mb，PacBio HiFi 的組裝結果 Contig N50 為 5.47 Mb，與此株細菌的基因體大小非常接近並且無需使用 NGS 數據進行 polish，單獨使用 PacBio HiFi Reads 即可組裝出微生物完整的染色體與質體！

Noisy long reads + NGS 的混合組裝結果 Contig N50 僅有 2.1 Mb，且如下圖所示有兩個 Bubbles 存在，表示此組裝結果無法跨越重複序列區域 (repeat egion)，並且產生許多破碎的重疊群 (contig)。

	PacBio HiFi	Noisy Long Reads + NGS
Coverage	96X	69X (NLR), 34X (NGS)
Contig N50	5.47 Mb	2.1 Mb
Number of contigs	5	47
Run time	8 min	22 min
Assembler	Flye	Unicycler

