

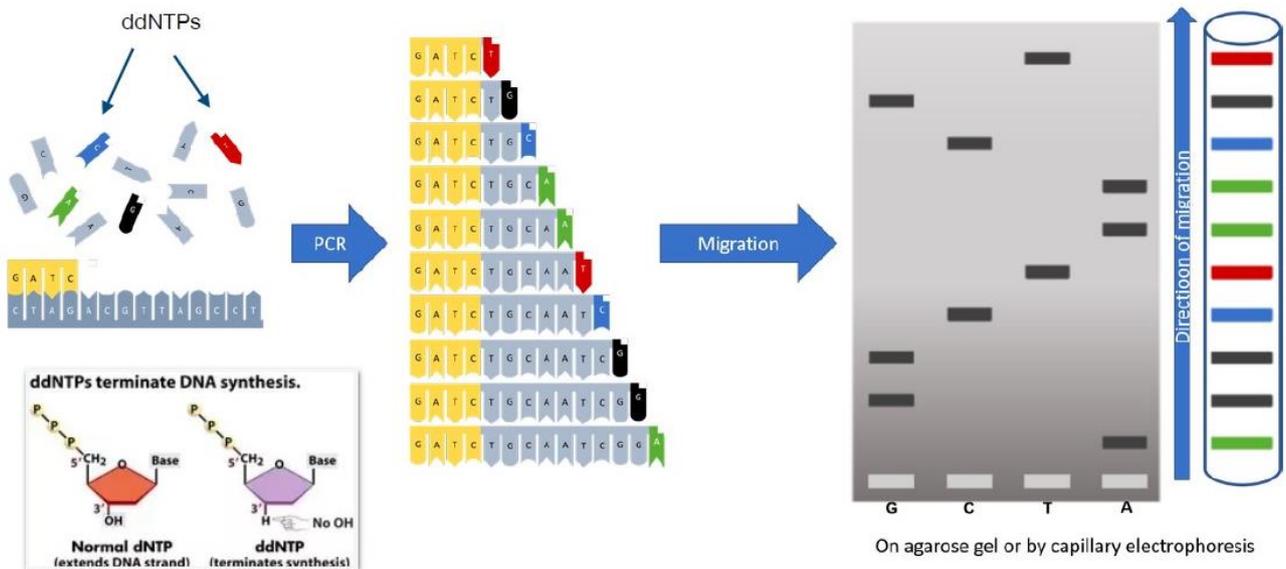
An overview of the Chinese version [2]

Sanger sequencing

Sanger 测序是一种基于 dideoxy 核苷酸链终止法的 DNA 测序技术，由 Frederick Sanger 于 1977 年发明。该技术可用于确定 DNA 序列，并已被广泛应用于基因组学、生物医学研究、医学诊断和其他领域。

在 Sanger 测序中，DNA 链被复制成许多短片段，每个短片段都以不同的方式以一种特定的 dideoxy 核苷酸（ddNTP）终止。ddNTPs 是一种缺少 3' 羟基的核苷酸，因此它们无法进一步扩展 DNA 链。一旦 ddNTP 终止了 DNA 链的扩展，它就标记为 DNA 链的终点。

这些终止片段然后通过电泳分离，并可视化为带状图，该带状图可用于确定 DNA 序列。因为每个片段以不同的 ddNTP 终止，因此每个片段的终止位置不同。通过将这些位置对齐，可以确定 DNA 序列。



illumina sequencing (DNA-Seq)

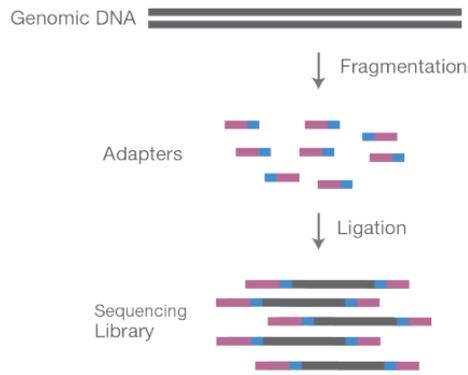
Illumina 测序是一种高通量 DNA 测序技术，它使用高度并行的技术，能够同时处理数以百万计的 DNA 片段。该技术可以快速、准确地测定 DNA 序列，已被广泛应用于基因组学、生物医学研究、药物开发和其他领域。

在 Illumina 测序中，DNA 样本首先被随机断裂成短片段，然后连接到测序适配器中。适配器中包含一系列引物序列，这些引物序列将 DNA 片段固定到 Illumina 测序芯片上的表面。每个 DNA 片段的两端都与适配器连接，并在芯片上形成一个桥形结构，该结构可以被扩增和测序。

扩增时，每个 DNA 片段被复制成数百万个完全相同的 DNA 复制品，这些复制品被绑定到芯片表面上的不同位置。接下来，测序反应会逐个加入碱基，并测量每个加入碱基的亮度信号。这些亮度信号被用来确定 DNA 序列。

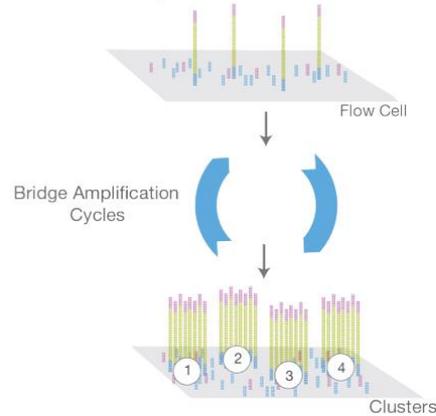
Illumina 测序的优点包括高通量、高精度、高效率 and 低成本。该技术已经成为了现代基因组学和生物医学研究中最常用的测序技术之一。

A. Library Preparation



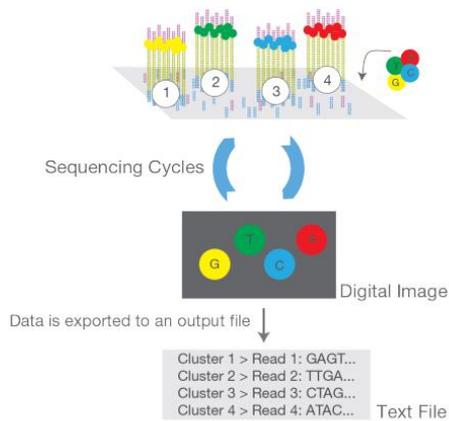
NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

B. Cluster Amplification



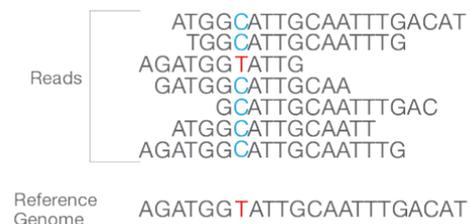
Library is loaded into a flow cell and the fragments are hybridized to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

C. Sequencing



Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

D. Alignment and Data Analysis



Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

illumina sequencing (RNA-Seq)

利用 Illumina 测序技术测量多个 mRNA 的序列，通常采用 RNA 测序（RNA-Seq）技术。RNA-Seq 技术是一种高通量的 RNA 测序技术，可以通过测量 RNA 样品中每个转录本的数量和表达水平来研究基因表达。

以下是一些用于 Illumina 测序测量多个 mRNA 序列的步骤：

1. RNA 提取和纯化：RNA 样本首先通过提取和纯化来获得高质量的 RNA。
2. RNA 逆转录和合成 cDNA：RNA-Seq 实验通常通过逆转录 RNA 和合成 cDNA 来转录 RNA 到 DNA，并生成适合 Illumina 测序的 DNA 片段。这通常涉及使用反转录酶将 RNA 转录为 cDNA，并通过添加随机引物来扩增 cDNA。
3. DNA 文库构建：将 RNA 逆转录得到的 cDNA 片段，接上 Illumina 测序适配器，以构建一个 DNA 文库，该文库可以在 Illumina 测序仪上进行测序。
4. Illumina 测序：DNA 文库经过 Illumina 测序仪的高通量测序，生成大量短序列读取，这些序列可以用于鉴定和量化 RNA 样本中的转录本。这些序列可以被比对到参考基因组上，以确定它们来自哪个基因和剪接变体，并且可以计算每个基因的表达水平。
5. 数据分析：测序数据可以通过各种分析软件进行处理，包括比对、表达定量、基因注释、通路分析等。

总之，RNA-Seq 是一种利用 Illumina 测序技术测量多个 mRNA 序列的强大工具，可以提供高通量和高分辨率的基因表达信息，从而有助于理解生物体内的基因调控和功能。

ChIP-seq

ChIP-seq 是一种生物技术，用于检测蛋白质与 DNA 之间的相互作用，特别是蛋白质与染色质上的靶标 DNA 序列的相互作用。**ChIP-seq 技术可以用于研究转录因子、组蛋白修饰酶等与基因表达和表观遗传调控相关的蛋白质与 DNA 相互作用。**

ChIP-seq 技术通常包括以下步骤：

1. 交联：将目标细胞进行交联，使蛋白质与 DNA 形成交联物，从而固定它们的相互作用。
2. 染色质免疫共沉淀（ChIP）：使用特定抗体识别感兴趣的蛋白质，并利用免疫学技术将其与 DNA 相互作用的部分共同沉淀下来。
3. DNA 提取：使用特定的酶将 DNA 从免疫沉淀物中释放出来，并对其进行提取和纯化。
4. DNA 文库构建：将 DNA 片段连接到 Illumina 测序适配器上，并进行 PCR 扩增以获得足够的 DNA 片段数量。
5. Illumina 测序：使用 Illumina 测序技术对 DNA 文库进行测序。
6. 数据分析：测序数据可以通过比对到参考基因组上，并通过统计学方法鉴定在基因组上显著富集的区域，从而确定蛋白质与 DNA 相互作用的位置。这些区域可以与已知的基因、转录因子结合位点或者其他调控元件相关联，从而帮助研究人员了解蛋白质与 DNA 相互作用的功能。

总之，ChIP-seq 是一种用于研究蛋白质与 DNA 相互作用的技术，可以帮助研究人员深入了解基因表达和表观遗传调控的机制，从而有助于理解生物体内复杂的分子相互作用网络。

ATAC-Seq

ATAC-seq 是一种用于研究基因组中开放染色质区域（accessible chromatin）的技术。开放染色质区域是指染色质上的 DNA 序列可以被核酸酶等酶切割，形成开放的染色质结构，这些区域往往与基因表达、表观遗传修饰等生物学过程密切相关。

ATAC-seq 的原理基于 Tn5 转座酶，Tn5 转座酶是一种可具有双重切割和连接作用的酶，能够在开放的染色质区域上切割 DNA，并在 DNA 上插入一个 DNA 适配器。在 ATAC-seq 实验中，首先从细胞中提取染色质 DNA，然后使用 Tn5 转座酶将 DNA 适配器插入到开放的染色质区域上。然后，通过 PCR 扩增和 Illumina 测序，可以得到开放的染色质区域的 DNA 序列。

ATAC-seq 相对于传统的 DNase I hypersensitivity 和 FAIRE-seq 等技术的优点在于，ATAC-seq 不需要显式地切割染色质，因此样品数量可以更少，需要的时间和样本准备也相对较少。此外，ATAC-seq 技术能够检测到小的开放区域，这使得 ATAC-seq 成为测量单个细胞的开放染色质区域的方法之一，有助于研究细胞异质性、发育和疾病等方面的问题。

总之，ATAC-seq 是一种用于检测基因组开放染色质区域的技术，能够帮助研究人员深入了解开放染色质区域与基因表达和表观遗传调控等生物学过程之间的关系。

Bisulfite sequencing

具体来说，在 Bisulfite sequencing 中，DNA 首先被处理成单链，然后暴露在含有亚硫酸盐的碱性条件下。这个过程会将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶（Uracil），但甲基化的胞嘧啶不受影响。接下来，将 DNA 单链反转录成双链，并进行 PCR 扩增，生成的 PCR 产物经过 Illumina 测序。然后，通过比较每个胞嘧啶的甲基化状态来推断甲基化模式。比如，未经甲基化的胞嘧啶会被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶则不受影响，因此甲基化的胞嘧啶可以通过测序检测到。

Bisulfite sequencing 是一种广泛使用的技术，用于研究 DNA 甲基化模式在生物学和医学中的各种方面，如表观遗传调控、癌症和遗传疾病等。它的主要优点是**高分辨率和全基因组覆盖**，可以检测到单个细胞水平的甲基化状态，帮助研究人员深入了解基因组中甲基化模式的复杂性。

Bulk RNA-Seq & Single cell RNA-Seq

Bulk RNA-Seq 和 single cell RNA-Seq 都是 RNA 测序技术，但它们在样本类型、分析对象、分辨率和数据处理等方面存在差异。

Bulk RNA-Seq 是一种用于分析混合细胞群体的 RNA 测序技术。它是从样品中提取 RNA，然后将 RNA 逆转录成 cDNA，通过高通量测序，最终得到每个基因的表达量数据。由于在 Bulk RNA-Seq 中，分析的是从许多细胞中提取的 RNA，所以它提供了每个基因在总 RNA 样品中的平均表达水平，但无法区分单个细胞中的基因表达差异。因此，Bulk RNA-Seq 通常用于研究细胞群体的平均表达水平以及不同条件下的基因表达变化。

Single cell RNA-Seq 则是一种高通量技术，它允许我们在单个细胞水平测量 RNA 的表达水平。在 Single cell RNA-Seq 中，单个细胞被分离并转移到微型孔中，然后通过逆转录和测序，得到每个细胞的 RNA 表达水平信息。这种技术可以帮助我们深入了解细胞类型、分化、发育过程以及细胞状态的异质性。它提供了更高的分辨率，允许我们研究个体细胞的表达差异，并帮助识别新的细胞亚型。

由于 Bulk RNA-Seq 和 Single cell RNA-Seq 具有不同的分辨率和优缺点，因此它们可以用于不同的研究目的。Bulk RNA-Seq 适用于研究群体表达，单细胞 RNA-Seq 适用于研究单个细胞的表达水平和异质性。

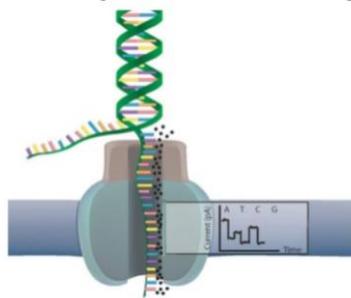
Real time sequencing

Real-time sequencing 是指可以在 DNA 或 RNA 复制反应进行过程中进行 DNA 或 RNA 序列的实时检测的测序技术。这种技术通常称为实时测序或即时测序。

与其他传统的测序方法不同，如 Sanger 测序和 Illumina 测序等，实时测序的过程中 DNA 或 RNA 合成反应是连续的，可以不断地产生新的序列数据。该技术可以在较短的时间内获得高质量的序列数据，并且可以实时监测 DNA 或 RNA 复制过程中的错误。

实时测序技术通常使用一种叫做“**荧光比色法**”的技术进行实时检测。在此技术中，不同的碱基被标记成不同的荧光信号，每当一个新的碱基被加入到 DNA 或 RNA 序列中时，荧光信号就会发生改变。通过实时监测这种荧光信号的变化，我们可以追踪 DNA 或 RNA 的复制过程，并记录下每个碱基的序列。

实时测序技术有多种不同的方法，如 PacBio 的单分子实时测序（Single Molecule Real-Time Sequencing）和 Oxford Nanopore 的纳米孔测序技术（Nanopore Sequencing）。这些技术已经广泛应用于基因组学、转录组学、表观遗传学等领域，可以帮助研究人员更全面地理解基因表达、基因组结构和功能、突变等方面的生物学问题。



Oxford Nanopore Sequencing

Oxford Nanopore Sequencing (ONT) 是一种新兴的基于纳米孔技术 (Nanopore Technology) 的 DNA 测序技术。与传统测序技术相比, ONT 具有以下优点:

1. **直接测序:** ONT 可以直接对 DNA 分子进行测序, 而不需要进行 PCR 扩增或建库。这样可以避免由 PCR 扩增引入的偏差和错误, 从而提高测序准确性。
2. **长读长:** ONT 的读长可以达到数十到数百千碱基, 比 Illumina 等传统测序技术的读长更长。这种长读长可以更好地解决基因组重复序列和基因组重组等问题。
3. **实时测序:** ONT 是一种实时测序技术, 可以实时地监测 DNA 分子通过纳米孔时的电信号变化, 从而提供快速的测序速度和实时数据。
4. **应用广泛:** ONT 不仅可以用于基因组测序, 还可以用于转录组学、表观遗传学、病毒学、微生物学、人类遗传学等领域。

然而, ONT 技术的精度仍然需要改进, 且数据分析过程也相对较为复杂。因此, 在实际应用中, 需要根据具体实验目的和需求选择合适的测序技术。