

FAQ

Q1: 建库所需的样品总量和浓度有什么要求?

A1: 不同文库所用的试剂盒对样品总量和浓度有不同的要求, 具体要求见《高通量测序样品要求及注意事项》, 为了保证文库质量, 在条件允许的情况下请尽可能多提供一些样品。

Q2: 对建库所用样品的保存和运输有什么要求?

A2: 一般情况下, DNA 样品应保存于-20℃, RNA 样品应保存于-80℃, 若长期保存最好都置于-80℃; DNA 样品运输可选用冰、干冰或液氮, RNA 样品应保存于干冰或液氮中运输。

Q3: 构建的 RNA 文库是不是也包含了 small RNA?

A3: 不是的, 在 RNA 文库构建中会先进行 mRNA 的纯化, 只有带有 poly A 尾的 mRNA 会被保留下来, small RNA 没有 poly A 尾, 所以在纯化的过程中已丢失。若要做 small RNA 分析, 需要专门构建 small RNA 文库。

Q4: 你们是否提供链特异性 RNA 文库构建服务?

A4: 提供, 若要构建链特异性 RNA 文库请在样品信息单中选择建库类型“Directional RNA-Seq”。

Q5: 我们提交样品后多久能够得到测序结果?

A5: 样品提交后要经过样品质检→文库构建→文库质检→上机测序→数据初步分析等几个阶段, 一般情况下, 一个月左右就能获得结果。

Q6: 如何选择所构建 DNA 文库片段的大小?

A6: 单端测序 (single end) 最优的片段大小是 150-300bp, 双端测序 (paired end) 最优的片段大小为 250-500bp。目前, 我们提供 180bp、300bp 和 500bp 三种大小的 DNA 文库构建服务, 180bp 大小文库采用双端测序能够测通, 而 300bp 和 500bp 大小的文库则无法测通。文库大小的选择还与基因组的复杂度和重复序列多少有关, 大文库有利于高重复序列基因组 DNA 序列的拼接。

Q7: 你们是否提供 rRNA Removal 的 RNA 建库服务?

A7: 提供, 若要构建 rRNA Removal 的 RNA 文库请在样品信息单中选择建库类型“rRNA Removal RNA-Seq”。, 并自行提供去除 rRNA 的试剂盒。

Q8: 如何确定测序所需的数据量?

A8: 测序所需的数据量与研究类型、基因表达丰度、基因组大小有关, 同时还与已发表文献中已使用的数据覆盖度有关。一般而言, 对全基因组重测序 SNP 分析, 可以采用 30-50X 的覆盖深度。对 RNA 测序, 一般要求 4G 的数据量, 若要获得低丰度的转录本, 还要进一步增加数据量。

Q9: small RNA 建库提交样品前是否要先分离纯化 small RNA?

A9: 不需要, small RNA 文库构建直接以 total RNA 起始。利用 small RNA 在 5'端带有磷酸基, 3'端带有羟基的特性, 直接在两端连上接头, 再通过反转录、PCR 扩增和 PAGE 胶电泳回收最终获得 small RNA 文库。

Q10: 以 total RNA 起始所构建的 small RNA 文库中会有 mRNA 或 rRNA 污染吗?

A10: 一般不会, 因为在 small RNA 建库过程中需要进行 PAGE 胶电泳纯化, 只有符合 small RNA 大小的片段才回收。因此, 只有降解或断裂到与 small RNA 片段大小相同且两端连接上正确接头的 mRNA 或 rRNA 才有可能被引入 small RNA 文库, 而样品建库前都要经过严格的质检, 降解的样品是不建议建库的, 所以 mRNA 或 rRNA 污染的概率是很小的。

Q11: 单端测序与双端测序有什么不同, 该如何选择?

A11: 单端测序指在测序过程中只从构建的文库一段读取 100bp 长度, 而双端测序则分别从文库两端各读取 100bp 长度。一般而言, small RNA 文库和 ChIP 文库按不同需求可以选择单端测序 (也可用双端测序), 而其它文库基本采用双端测序。

Q12: 与 microarray 技术相比较, NGS 技术有什么优点?

A12: 相对与 microarray 技术, NGS 技术有如下一些优势:

- a. NGS 技术可以在基因组序列未知的情况下进行测序, 而 microarray 技术则要求已知的基因组信息来设计芯片上的探针序列
- b. NGS 技术的结果中可包含一些未知的序列信息, 而 microarray 技术只能检测到芯片上已有的序列信息, 而无法检测未知序列
- c. 基于杂交原理的 microarray 技术在检测相似序列时分辨率较低, 通常会存在 cross-hybridization 的问题; 而 NGS 技术的分辨率可以达到一个碱基, 能够轻易区分单个碱基的不同
- d. NGS 技术样品要求量低, microarray 技术样品要求量高; NGS 技术信噪比较高, microarray 技术信噪比较低。