

MGIEasy RNA 方向性文库制备试套装 FAQ

应用类

1. 推荐的测序策略及数据量？

RNA-seq (转录组): 选择插入片段 150-300 bp, PE100, 8G raw data;

RNA-seq (转录组): 选择插入片段 200-500 bp, PE150, 10G raw data。

2. Reads 在参考基因上分布不均匀说明什么？

一般来说, 如果测序随机性好, reads 会在参考序列上呈均匀分布, 若分布不均匀, 可能是 mRNA 发生降解、DNA 污染或建库过程出现异常, 如 mRNA 富集操作不当或 rRNA 去除的不干净。

3. 为什么下机数据与参考基因比对率会低于与参考基因组的比对率？

三种可能的原因: 1、用于比对的参考基因集本身不够完整; 2、存在新转录本; 3、mRNA 前体的存在使得测序数据中包含非编码区, 导致能比对上参考基因组而无法比对上参考基因。

4. RNA-seq 是否需要做生物学重复？

高影响因子杂志通常会要求 RNA 表达量分析进行生物学重复实验, 推荐三个或三个以上的重复设置。

5. RNA-seq 与 qPCR 验证结果不一致如何解释？

首先排除样本对照和处理是否弄反, 用于验证的基因表达量是否偏低 (建议选择差异倍数在 5-10 倍的基因), 或测序与 qPCR 不是同一样本。如果大部分基因都验证上只有少部分不一致, 也是正常的, 因为两种方法本身存在差异: 1、实验: qPCR 实验方案、引物序列设计探针, 如探针是否考虑多转录本情况; 而 RNA-seq 测序可能存在 GC 偏向性, 从而影响表达量结果; 2、数据分析: RNA-seq 经历了建库、测序和信息分析等一系列复杂过程, 任何参数的改变都可能会造成结果的差异; 3、该基因存在新的可变剪切; 4、用于比对的数据库不完整, 大部分参考序列不是全长, 造成比对上某一转录本的 reads 也会偏少; 建议去 NCBI 下载全长后再做后续验证。

样本类

1. 适用于哪些物种？

人、动植物、微生物都适用, 需根据物种自行选择 RNA 富集的方法。人、动植物和真菌可采用 mRNA 钓取或 rRNA 去除的方法, 原核生物可选用 rRNA 去除的方法。

2. FFPE 样本是否适用？

适用。说明书中有建议的质量判断标准及建库条件推荐。

3. 对 RNA 样本提取的建议？

1) RNA 提取质量的好坏主要取决于样品本身的质量即新鲜程度, 要确保样品足够新鲜, 取材后需立即液氮速冻然后保存于 -80℃ 冰箱中, 在提取之前尽量不要让样品发生冻融;

2) 针对不同类型的样品选择合适的提取方法;

3) 提取过程中注意对 RNase 的防护, 穿实验服, 戴好口罩及手套, 提取过程中勤换手套;

4) 提取用枪头及离心管等需用 RNase free 产品 (如 AXYGEN 公司相关耗材), 所有提取试剂需用 0.1% DEPC 处理过夜后高温灭菌 30min 方能使用或购买 Ambion 公司的 RNase free 试剂。

4. 提取 RNA 时是否可用 LiCl 沉淀?

可以使用 LiCl 进行沉淀, 虽然 LiCl 会使小分子 RNA 部分丢失但并不影响基因表达谱分析。但如果是基因表达谱和小 RNA 同时进行研究的项目, 建议不要使用 LiCl 沉淀 RNA。

5. RNA 是否需要 DNase 处理?

需要。RNA 样本中残留的 DNA 较多时, 会影响到数据结果, 测到比较多的内含子序列。

6. 对样本的质量要求?

RNA 浓度: $\geq 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (总量 $\geq 1 \mu\text{g}$)

RNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.8\sim 2.0$

RNA 完整度 (使用 Agilent Bioanalyzer 检测): $\text{RIN} \geq 7$, $28\text{S}/18\text{S} \geq 1.0$, 植物和昆虫样本可能会出现 RIN 值为 N/A, 需要根据基线是否平稳来判断, 若基线上抬则说明样本有降解, 会影响建库及测序结果。

7. RNA 起始量最低需要多少?

最低可至 10ng total RNA 起始, 人鼠建议起始量 200ng, 非人鼠 1 μg 。这样的起始量可以保证较好的建库成功率和数据质量。

8. 合成的 cDNA 样品是否适用?

不适用。因为我们的试剂盒需要在 RNA 阶段进行片段化, 若提供的是 cDNA 样品, 则无法进行片段化操作。

操作类

1. 推荐及最多多少样本一条 lane? 是否可以和其他文库一起 pooling 上机?

BGISEQ-500 平台推荐最多 16 样本 1lane, 所用 barcode 需是成套的 barcode 组合 (如 1-4,13-16,97-104), 可根据需求混合测序。

MGISEQ-2000 平台推荐最多 8 样本 1lane, 所用 barcode 需是成套的 barcode 组合 (如 1-4,13-16,97-104), 可根据需求混合测序。

2. mRNA 钓取富集时没有使用不粘管会有影响吗?

有影响。非不粘管会粘附少量 rRNA 在管壁上, 导致最终数据中 rRNA 比例增加约 3%。

3. 稀释后的 Directional RT Buffer 2 未使用完, 是否可以留到下次使用?

不能, 稀释后的 Directional RT Buffer 2 不稳定, 当次未使用完要丢弃。

4. 是否有建库操作安全终止节点? 每个安全终止节点产物可保存多久?

合成二链 cDNA 后纯化的产物可在 -20 度冰箱保留一周左右, PCR 纯化后产物在 -20 度冰箱可以保留至少一个月。

5. 片段选择的方法?

磁珠筛选。方便快捷, 便于自动化。

6. 做 200-500bp 插入片段时, 接头连接后可以不纯化直接双选吗?

不能。必须先常规纯化一次再进行双选, 否则反应体系里面的成分会影响双选的片段

分布。

7. 常见建库失败原因？

样品质量差，存在杂质污染，环境中的 RNase 污染，人为操作因素等。

8. 文库质控标准？

质量指标名称	质量指标	测量方法
PCR 产物片段大小	150-500 bp 或 200~500 bp	Agilent 2100 Bioanalyzer 检测
环化产物分子数	>80 fmol	Qubit® ssDNA 试剂盒定量检测

9. 试剂盒储存有什么需要注意的地方？

按说明书中的储存条件即可。

10. 说明书中两种试剂盒富集有何区别？更推荐哪一种？使用其他的 mRNA 分离试剂盒是否可以？

两种试剂盒富集效果没有差别，都可以使用。我们没有测试过其他 mRNA 分离试剂盒，暂不推荐其他 mRNA 分离试剂盒。

11. 插入片段及文库的主带范围？

片段化条件为 94°C 8min 时，插入片段约为 150bp；文库 PCR 产物主带在 150~500bp，峰值约为 230bp。

片段化条件为 87°C 6min 时，插入片段约为 220bp；文库 PCR 产物主带在 200~500bp，峰值约为 300bp。

12. 不同物种类型的样品对打断条件是否有不同的要求？

不同物种类型的样品打断条件一样。

13. 针对不同物种 PE150 测序是否有推荐的建库条件？

物种	Total RNA input	片段化条件	双选条件	PCR cycles
人	200ng	87C 6 min	0.65x+0.2x	14
动物	1ug	87C 6 min	0.65x+0.2x	14
植物	1ug	87C 6 min	0.65x+0.2x	14
微生物	1ug	87C 6 min	0.65x+0.2x	14