

# MGIEasy RNA 文库制备试套装 FAQ

## 应用类

### 1. 推荐的测序策略及数据量？

推荐 RNA-seq (Quantification): 选择插入片段 150-300 bp, SE50, 25M raw reads;

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. 什么情况选择单端测序？

如果只需要定量分析差异基因表达情况, 不需要转录本结构及变异分析, 测 SE50 即可。

### 3. 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。

### 4. 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。

### 5. 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。

### 6. 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 钩取或 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：≥40 ng/μL（总量≥1 μg）  
RNA 纯度：OD260/280=1.8~2.0  
RNA 完整度（使用 Agilent Bioanalyzer 检测）：RIN≥7，28S/18S≥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 1μg。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. **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。
4. **片段选择的方法？**  
磁珠筛选。方便快捷，便于自动化。

5. 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。

6. 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。

7. 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

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 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。

12. 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	200ng	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