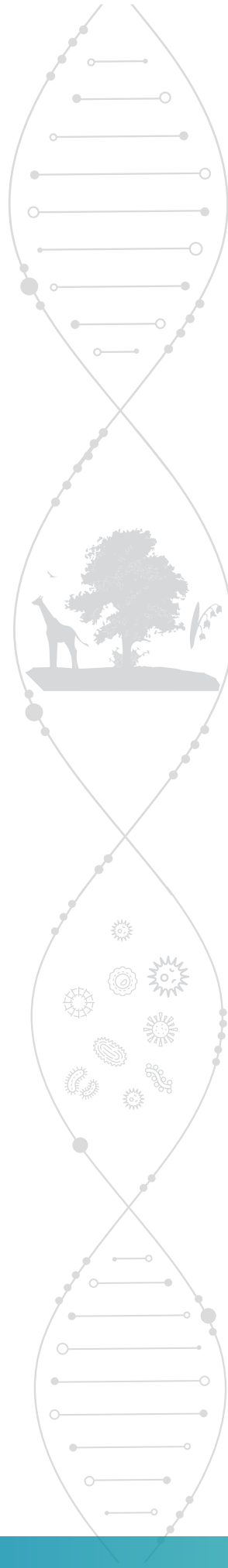


MGI

微生物RNA测序组合产品

FAQ



微生物RNA测序组合产品

MGI微生物RNA测序组合产品以华大智造自主研发的试剂、自动化样本制备系统、高通量测序平台以及数据处理系统为基础，覆盖从样本核酸提取到结果输出，致力于对引起人或动物不明原因感染的微生物进行快速、准确、全面的RNA测序，为客户提供从样本到检测报告的全流程组合产品。

本说明旨在针对该组合产品在检测过程中的一些常见问题进行汇总，以便使用者能够顺利地完成微生物RNA测序。

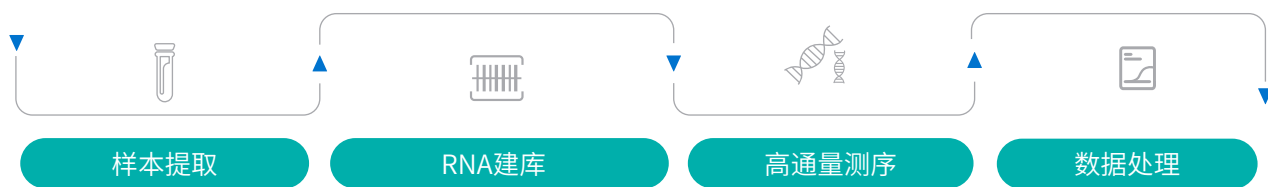


图1 微生物RNA测序的工作流程

FAQ



样本提取



MGI微生物RNA测序组合产品适用的样本类型有哪些？

本组合产品使用MGIEasy 核酸提取试剂进行样本核酸提取，适用于咽拭子、鼻拭子、肺泡灌洗液等呼吸道样本。

➔ MGIEasy 核酸提取试剂的原理?

该试剂盒包含与核酸有效结合的超顺磁珠。MLB缓冲液可裂解病毒，释放病毒DNA/RNA；加入乙醇后，超顺磁珠可通过氢键和静电相互作用特异性吸附核酸，但不吸附蛋白质和杂质。与核酸结合的磁珠通过MW1洗涤以去除非特异性吸附蛋白或蛋白酶K，然后再经过MW2的洗涤去除吸附在磁珠上的盐。最后经过无核酸酶水洗脱，获取高纯度核酸溶液。

➔ 如何避免气溶胶污染?

PCR扩增能够产生大量的扩增产物，增大气溶胶污染的风险，所以实验时需要进行严格的操作区域划分，至少分为扩增前后区。

表1 操作分区

| 区域 | 扩增前区 | 扩增后区 |
|------|---------------------|--------------------|
| 实验操作 | 核酸提取； | RNA建库2 (文库构建) 的产物； |
| | 去除RNA； | DNB制备； |
| | RNA建库1 (合成双链cDNA)； | 测序试剂准备 |
| | RNA建库2 (文库构建) 的试剂配制 | |

➔ 潜在含病毒样本的灭活方法?

56°C孵育30分钟进行灭活处理。

➔ 不同类型样品的提取前处理

- 咽拭子，鼻拭子：如果拭子保存在保存液中，请吸取上清液进行核酸提取；如果没有保存液，请将拭子头浸入500 μ L 1 \times PBS缓冲液 (pH值为7.4) 中，涡旋混匀，吸取上清液进行核酸提取。
- 肺泡灌洗液：涡旋混匀，吸取上清液进行核酸提取。

核酸提取产物的成分是DNA还是RNA?

MGIEasy 核酸提取试剂主要用于病毒核酸,包括 DNA 和 RNA,但不适用于从其他微生物中提取核酸。提取产物是 DNA 和 RNA 的混合溶液。因为提取产物用于高通量测序,所以在提取过程中不需要加入增强剂(Enhancer Buffer)。使用 MGISP-100RS 自动化提取时,裂解结合液配制方法如下: 160 μ L 裂解液(Buffer MLB), 200 μ L 无水乙醇, 15 μ L 蛋白酶 K 和 15 μ L 磁珠 M。

核酸提取产物的核酸纯度和浓度如何?产物浓度太低怎么办?

一些种类临床样本含有较低含量的病毒核酸,如咽拭子、鼻拭子,所以这些样本的提取产物不适合使用 OD260/OD280 测定病毒核酸纯度或 Qubit 测定其浓度。如果是已知病毒种类的样本且一定需要知道提取产物中的病毒含量,推荐使用 qPCR 进行定量。

缓冲液混合液可以提前配制并长期保存吗?

裂解结合液中的裂解液(Buffer MLB)和无水乙醇可以提前配制并长期保存。使用前再添加其他试剂,如蛋白酶 K、磁珠 M。完全配制好裂解结合液后需在 30 分钟内使用。

洗涤液 MW1 和洗涤液 MW2 可加入无水乙醇并长期保存。

使用 MGISP-100RS 进行自动化核酸提取的通量与时间?

不同提取通量下,其运行时间存在差异。

表2 自动化核酸提取的通量与时间

| | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|
| 通量 | 8 rxn | 16 rxn | 24 rxn | 32 rxn |
| 运行时间 | 40 min | 55 min | 70 min | 80 min |

核酸提取过程中,手工操作时是否需要带滤芯的吸头?

需要使用带滤芯的吸头,一方面可以降低 RNA 降解的风险,一方面可以降低样本间交叉污染的风险



RNA建库前是否样本需要进行DNase I处理?

这取决于提取样本中的核酸产量以及DNA比例。若核酸提取产物中有较高比例的基因组DNA污染且RNA产量较多的情况下,可用 DNase I进行消化处理。但因DNase I消化会造成一定量的RNA损失,所以total RNA投入量需要比预期的建库投入量适当增加20%~30%。通常情况下,咽拭子、鼻拭子这类样本提取产物的核酸量低,无需做 DNase I消化处理。

RNA建库是否需要去宿主rRNA?

对于不同的样本和需求可选择不同的策略。MGIEasy rRNA去除试剂盒可去除寄主total RNA中rRNA,适用的寄主包括人、小鼠及大鼠。

RNA样本如果做rRNA去除,则有利于提高测序数据的利用率,但会在反应过程中增加RNA样本的损失、降低文库产量,特别不利于低投入量模板的建库;如果不做rRNA去除,则能够最大程度降低RNA样本的损失,但测序中会产生更多的无效数据(rRNA数据),降低数据利用率。所以,使用者可以根据样本的具体情况与实验需求综合考虑建库策略。

如下表,在不同测序策略下,单样本测序量是在RNA样本已做了rRNA去除的情况下进行推荐的。

表3 微生物RNA测序组合产品的推荐测序策略

| 用途 | 推荐读长 | 推荐载片 | 推荐样本通量 /Run | 单样本测序量 (M) |
|------------------|-------|------|-------------|------------|
| 微生物快读识别 | SE50 | FCS | 4 | ≥ 20 |
| 微生物快速识别 与组装溯源 | PE100 | FCL | 4 | ≥ 100 |

RNA建库过程中,手工操作时是否需要带滤芯的吸头?

当产物中的核酸仍以 RNA 状态存在时需要使用带滤芯的吸头,如去除 rRNA 和进行逆转录的过程。一方面可以降低 RNA 降解的风险,一方面可以降低样本间交叉污染的风险。

为什么有些情况下接头需要进行稀释?

接头是否稀释以及如何稀释取决于RNA的建库投入量。反应过程中加入过多的接头会导致文库中残留大量接头或接头二聚体,从而降低可利用的测序数据量。

RNA建库有哪些环节?哪些环节能够使用MGISP-100RS?

RNA建库包括4个主要环节,rRNA去除、RNA建库1(双链cDNA合成)、RNA建库2(文库构建)、制备DNB。其中MGISP-100RS能够一次对16份样本进行建库,包括三个环节rRNA去除、RNA建库1(双链cDNA合成)、RNA建库2(文库构建)。制备DNB需要手工操作。

表4 RNA建库的环节

| | 步骤 | |
|----------------------|-----|------------|
| | 操作 | 运行时间 |
| 去除rRNA | 自动化 | 2 h 20 min |
| RNA建库1 (双链cDNA合成) | 自动化 | 2 h 45 min |
| RNA建库2 (文库构建) | 自动化 | 4 h |
| 制备DNB | 手工 | 40 min |

→ 使用MGISP-100RS过程中, 建库试剂用量的适配性?

自动化建库时, 实际试剂的使用量一般会高于试剂的理论反应量。

所以, 使用MGISP-100RS进行rRNA去除时, MGIEasy rRNA 去除试剂盒 (32 RXN) (MGI, 1000005953) 中的试剂需先进行手工分装, 再进行自动化反应。该试剂盒中的试剂装量只能进行1次16 RXN的自动化实验。

使用MGISP-100RS进行RNA建库时, 若客户使用MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装 (16RXN) (货号: 940-000107-00) 中的MGIEasy RNA文库制备试剂盒 (16RXN) (货号: 1000005274) 进行RNA建库, 试剂无需分装可直接用于自动化实验。

若客户使用了MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装 (96RXN) (货号: 940-000108-00) 中的MGIEasy RNA文库制备试剂盒 (96 RXN) (货号: 1000005276) 进行RNA建库, 需先进行手工分装 (见下表), 再进行自动化反应。该试剂盒中的试剂装量能进行约4次16 RXN的自动化实验。

表5 MGIEasy RNA文库制备试剂盒 (96 RXN) 各组分分装体积—RNA建库1 (合成双链cDNA)

| | 试剂 | 分装量 |
|--|--------------------------|-------------|
| MGIEasy RNA 文库制备 试剂盒 (96 RXN) (货号: 1000005276) | Fragmentation Buffer | 105 μ L |
| | RT Buffer | 105 μ L |
| | RT Enzyme Mix | 28 μ L |
| | Second Strand Buffer | 490 μ L |
| | Second Strand Enzyme Mix | 88 μ L |

表6 MGIEasy RNA文库制备试剂盒 (96 RXN) 各组分分装体积—RNA建库2 (文库构建)

| | 试剂 | 分装量 |
|--|-----------------|-------------|
| MGIEasy RNA 文库制备 试剂盒 (96 RXN) (货号: 1000005276) | ERAT Buffer | 143 μ L |
| | ERAT Enzyme Mix | 64 μ L |
| | Ligation Buffer | 475 μ L |
| | DNA Ligase | 42 μ L |
| | PCR Enzyme Mix | 500 μ L |
| | PCR Primer Mix | 110 μ L |

➔ PCR文库的质控标准?

文库质控指标为文库的片段分布大小与浓度。当同一类型样本的实验流程足够稳定后,无需每份文库都进行片段分布的检测。

表7 PCR文库的质控标准

| 质量指标 | 质控范围 | 测量方法 |
|-----------|------------|----------------------------|
| PCR产物片段分布 | 150-500 bp | Agilent 2100 Bioanalyzer检测 |
| PCR产物浓度 | >2.5 ng/μL | Qubit dsDNA定量检测 |

➔ DNB浓度偏低

请做如下排查:

- 是否按说明书要求进行规范操作;
- PCR 文库是否符合要求;
- 重新制备 DNB 时,适当增加 PCR 文库投入量。



➔ 测序试剂已解冻,但不能按时使用怎么办?

- 如试剂盒已经融化(包括 dNTPs),且不能按时使用,最多可再冻融一次;
- 如试剂盒已经融化(包括 dNTPs),且不能按时使用,可放在 4°C内暂存,并于 24 h 内使用,使用前需要重新混匀试剂槽;
- 如 dNTPs 和酶已经加入试剂槽中,即试剂槽已经准备完毕,若不能及时使用,可放在 4°C内暂存,并于 24 h 内使用,使用前需要重新混匀试剂槽;
- 如 dNTPs 和酶已经加入试剂槽中,即试剂槽已经准备完毕,且已经在仪器上下针,若不能及时使用,务必使用锡箔纸密封,放在 4°C内暂存,并于 24 h 内使用,使用前轻轻试剂槽,混匀时务必小心试剂不可从下针孔位中溢出,以免各孔位试剂之间污染影响测序质量。



➔ PFI是否只能用于人的样本数据处理,能否用于其他来源样本?

PFI收集的数据库涵盖了大于26000种微生物参考基因组,所以理论上适用于数据库覆盖范围内的分类需求。但PFI当前只测试过人或一些动物的样本数据,暂未扩展到其他环境样本,例如水体、土壤等,无法确定分析结果是否满足需求。

此外,一些环境样本例如水体,本身能提取到的核酸量就比较少或质量不理想,所以难以保证宏转录组实验的正常进行。

➔ PFI预置了哪些宿主的参考序列?

PFI预置了人、猪、山羊、绵羊、小鼠、大鼠、鲤鱼、家鹅、鸡、鸭、牛、猫、狗和兔等物种的宿主序列。

➔ 数据库菌株收集原则,具体包含了哪些库的信息?如何更新,多久更新一次?

目前的收集原则是来源于 RefSeq 的完整基因组序列,包括细菌(包括古菌)、病毒、真菌和寄生虫。可通过远程方式更新,频率通常一年一次。

➔ 为什么构建物种鉴定数据库使用 NCBI RefSeq?

NCBI RefSeq 经过 NCBI 严格的验证录入,相对于 NCBI 其他数据库,NCBI RefSeq 的序列更具有可靠性。

→ 华大智造的微生物测序组合产品与华大医学的PMseq™有什么区别？

- 智造的微生物快速识别软件分析得到的报告偏向科研型应用,我们会将鉴定出的全部微生物完整的在分析结果中呈现,用户根据自己的经验及需求对报告进行解读及验证;
- 华大医学的PMseq™得到的报告更偏向临床型应用,报告经过解读及人工审核,筛选出可能性最大的几种致病病原体,不会将所有鉴定结果全部呈现。

→ 为什么不同样本使用PFI处理出的未知物种比例/鉴定的特异reads数差异很大？

- 考虑到样本来源复杂且进行的是宏转录组测序,所以不同样本获取较大差异的结果就并不奇怪了。对于某些宿主或环境来说,公共数据库收录的相关微生物比较少,相应的我们的数据库中收录的也会比较少,所以这些场景下的微生物较难鉴定出来;
- 如果原始样本提取采用的试剂盒不是专门针对微生物的,也会导致一部分微生物核酸损失,由于微生物本身在原始样本中占比较少,导致鉴定到的微生物比例更少;
- 如果宿主序列不近缘,去除不干净,也会导致鉴定的特异reads比例变少。

→ 物种鉴定分析流程采用的是什么比对策略？

流程采用的是唯一比对策略, Read拆分成kmer,对各个kmer进行物种判断, kmer个数最多的物种为该read鉴定出的物种。

→ MGAP适用哪些使用场景？

MGAP 定位于对感兴趣的微生物进行基因组组装,并且根据组装结果进行溯源分析。对于含有多物种测序数据,需要先使用 PFI 进行微生物物种识别与 reads 分类,再提取感兴趣物种的测序数据进行 MGAP 组装。基于当前微生物 RNA 测序组合产品推荐的单样本数据量(PE100 单样本 100 M reads),推荐只做病毒类的基因组组装。若需要做细菌类的基因组组装,根据样本的不同情况,可能需要增大测序数据量。




深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

 www.mgi-tech.com

 MGI-service@mgi-tech.com

 4000-688-114



版本:2022年12月版 | MGPB011820105

仅供研究使用

版权声明:本手册版权属于深圳华大智造科技有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。
本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技有限公司及其提供者所有。