

高通量测序样品要求及注意事项

BIOPIC 面向北京大学校内提供高通量测序服务，所使用的测序仪为 Illumina 公司的 HiSeq 2500、HiSeq4000 测序仪等。为保证获得高质量的测序结果，一个重要前提是提供给我们高质量的 DNA、RNA 样品。请仔细阅读本说明并严格按照要求准备样品，这将帮助您得到最佳的测序数据和结果。如果所递交的样品质量不能符合下述要求，您的样品将不被处理并将被通知退回。接到我们的退回通知后，请到测序中心取回您的样品。通知一个月后未被领取的退回样品我们将不再保留。

一、 样品信息单

所有样品必须随同《样品信息单》一起递交，请在 BIOPIC 网站上下载表格或者联系中心的工作人员（62744052，sequencing@pku.edu.cn）索取表格。请详细填写信息单上所要求的各项样品信息及您的测序要求，[并发送至 sequencing@pku.edu.cn](mailto:sequencing@pku.edu.cn)，同样品一起递交至 BIOPIC 中心测序实验室。

二、 DNA/RNA 样品要求

我们接受的样品包括提取好的 Genomic DNA，Total RNA, ChIP-Seq 产物等。提交的 DNA 或者 RNA 样品由中心的工程师建立测序文库并上机测序，结果将以碱基序列的形式提交给用户。针对基因组测序、mRNA 转录组测序、外显子组测序、染色质免疫沉淀测序等不同测序要求，所需样品量略有不同，请参见下表：

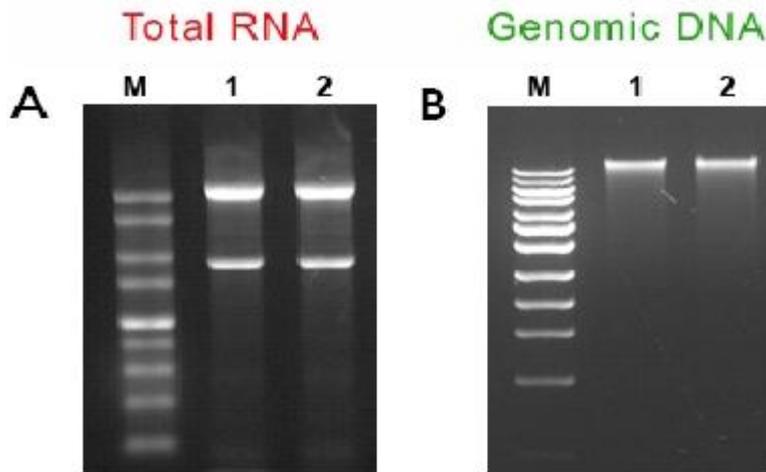
	建议总量/(最低量*)	建议浓度/(最低浓度*)
RNA 转录组测序 (polyA 选择)	1 / (0.1) μ g	100 / (20) ng/ μ l
链特异 RNA 测序	1 / (0.1) μ g	100 / (20) ng/ μ l
RNA 转录组测序 (rRNA 去除**)	5 / (1) μ g	200 / (50) ng/ μ l
Small RNA 测序	1 / (0.5) μ g	200 / (100) ng/ μ l
ChIP 测序	10 / (1) ng	2 / (0.2) ng/ μ l
Multi-PCR 产物高通量测序	10 / (1) ng	2 / (0.2) ng/ μ l
DNA 重测序	1 / (0.1) μ g	50 / (10) ng/ μ l
Human Exome 测序 (pooling)	1 / (0.1) μ g	50 / (10) ng/ μ l
Human Exome 测序	1 / (0.1) μ g	50 / (10) ng/ μ l
RRBS 甲基化测序	1 / (0.5) μ g	50 / (10) ng/ μ l
WGBS 甲基化测序	3 / (1) μ g	50 / (10) ng/ μ l

*最低量或浓度仅以 Pico Green (Qubit)检测结果为准，建库有一定风险。在样品量充足的情况下请按建议量提交样品。上述样品量的要求为一次样品制备所需量，如需多次制备样品，请按照制备次数计算样品总量。

** rRNA 去除试剂盒需自备。



为保证提交样品的质量，请随样品提供电泳胶图、Nanodrop 或 Agilent bioanalyzer 中一种或多种形式的样品检测结果。样品 OD 值 260/280 须大于 1.8，无蛋白质，或肉眼可见的杂质污染。Genomic DNA 应完整、无降解，电泳结果基因组 DNA 主带应在 λ -Hind III digest DNA marker 最大条带 23 Kb 以上且主带清晰，无弥散（参见下图 B）。Total RNA 应完整性良好，有清晰的 18S，28S 条带，如使用 Agilent Bioanalyzer 仪器检测应获得的 28S:18S \geq 1(小 RNA 测序，28S:18S \geq 1.5)，RIN \geq 8（参见下图 A）。ChIP-Seq 样品要求打断后 DNA 长度在 100-500bp 范围内，主峰在 200-300bp，最佳长度在 250bp 左右。



OD 值 260/280 小于 1.8，或不符合上述任何其他浓度、纯度等要求的样品将被退回。为减少样品污染，提高样品质量，建议使用以下试剂盒提取 RNA/DNA：

RNeasy Mini Kit Cat.No.74104；QIAshredder Cat.No.79654；RNase-Free DNase Cat.No.79254；Blood & Cell Culture DNA Mini Kit Cat.No.13323。

三、 样品保存及运输

请将制备好的 DNA 或者 RNA 样品保存在 TE buffer 或超纯水中，置于 1.5 ml 不黏管（如 Eppendorf LoBind Tube 或 Ambion Non-stick Tube）内。不黏管使用封口膜封好，并用记号笔或标签清晰、准确地标记样品编号、日期、PI 姓名首字母缩写，内容应与《样品信息单》一致。如需长期保存，请置于 -80°C 低温冷冻箱内。但为防止样品降解对测序的影响，我们接受的 DNA 样品冻存时间不超过三个月，RNA 样品冻存时间不超过一个月。运输中请使用足量的干冰，并选用较快的运输方式，以降低运输过程中样品降解的可能性。

请将样品和《样品信息单》一同递交至：

北京大学生物动态光学成像中心测序实验室（综合科研楼 337）。

四、 样品备份

我们建议您对递交的每一份样品在您实验室留有足量的备份。深度测序技术流程复杂，



在建立测序文库，上机测序过程中可能因不可控因素而出现失败导致样品损失，所以请确保测序失败后仍有足够量样品作再次测序。对于特别珍贵的样品（如古人类 RNA，珍稀生物样品等），请与测序实验室的工程师联系做特殊处理。

五、 测序结果

测序一般需要三周左右的时间。完成后您会收到 seq.account@pku.edu.cn 发出的邮件通知您测序已完成，请您及时来拷贝碱基序列数据（fastq 格式）。我们会在保存数据 2 个月之后删除，请您保存好自己拷贝的原始数据以免造成数据丢失。

六、 数据分析

对于下机的样品我们鼓励各位老师拷贝 FASTQ 文件自行进行数据分析处理；若课题组不具备数据分析能力，我们可提供一次性的以下项目的分析。具体分析内容，请见下表：

项目类型	分析内容
All	1、Data Filter: remove adaptors, contamination sequences, and low quality 2、Reads Count; Data quality; GC content
RNA 转录组测序	Map to RefSeq; Gene Expression List (RPKM)
链特异 RNA 测序	Map to RefSeq (strand specific); Gene Expression List (RPKM)
Small RNA 测序	Map to miRBase
ChIP 测序	Map to reference genome; Calling peak
Multi-PCR 产物高通量测序	Calling mutation
DNA 重测序	Map to reference genome; Calling SNP
Human Exome 测序	Map to target region; Depth and coverage; Calling SNP

七、 预付款规定

从 2012 年 6 月 1 日起测序服务实行预付费制度。具体规定如下：

请需要高通量测序的老师估计一下要开展的测序项目大约的花费，尽快将预支款存入设备部测序账户（我们建议一次存入约 3 个月的费用）。我们根据付费情况，安排已经预付费用的样品优先上机，并在测序完成后及时由测序收费邮箱 seq.account@pku.edu.cn 通知已完成测序样品收费情况，包含此次测序花费和预支账户余款。收到 email 后您就可以及时拷贝数据。预付款余款接近 0 时，请您尽快补足下一笔预付款，以免影响您的样品及时上机。预付款不足的样品将无法上机，对此我们十分抱歉。