

三代基因组测序送样要求

一、概述

第三代测序技术（Nanopore 测序）等对 DNA/RNA 样品要求比二代测序更严格，主要表现在如下几个方面：

1、建库起始量较多：

Nanopore 测序可以不经 PCR 扩增，直接以分离纯化的 DNA/RNA 分子进行测序。

2、DNA/RNA 的纯度要求高：

杂质的存在对数据质量及产量的影响较大。

3、DNA/RNA 完整要求高：

要求无降解或轻微降解，由于三代建库的插入片段较大，若完整度不佳，会直接影响测序质量和后续组装。

因此，在三代测序样本提取时，建议尽可能采用保存时间短的新鲜样本进行核酸提取，要根据不同物种的组织样本特点，采取不同的取样方案和核酸提取方法。对于如多糖多酚或各种次生代谢产物丰富的较难提取的组织样本，需要有针对性地增加样本量并选择合适的去除杂质的核酸提取方法，以获得足量的高质量的 DNA/RNA。

二、DNA 样品等级判断标准：

A 类：样本为合格样本，应同时满足以标准

A 类	DNA 样品澄清透明，无不溶物，无粘稠现象
	$Nc/Qc=0.95\sim 1.2$ 、 $A_{260}/_{280}=1.8\sim 2.0$ ， $A_{260}/_{230}\geq 2$
	无降解或轻微降解
	总量满足建库要求

B 类：样本为风险样本，该类型样本无法满足 A 类要求，但需同时不低于以标准。

B 类	DNA 样品澄清透明，无不溶物
	$Nc/Qc=0.95\sim 1.5$ 、 $A_{260}/_{280}=1.8\sim 2.0$ ， $A_{260}/_{230}\geq 1.8$
	中度降解
	总量满足单次建库要求 50%

C 类：样本为不合格样本，该类型样本可能出现以下一种或几种情况，远低于标准。

C 类	DNA 样有不溶物，颜色，或者非常粘稠
	$Nc/Qc > 1.5$ 、 $A260/280 < 1.8$ ， $A260/230 < 1.8$
	严重降解
	总量少于单次建库要求 50%

三、RNA 样品等级判断标准：

A 类：样本为合格样本，应同时满足以标准

A 类	RNA 样品澄清透明，无不溶物
	$Nc/Qc=0.95\sim 1.2$ 、 $A260/280=2.0\sim 2.2$ ， $A260/230 \geq 2$
	RIN 值 ≥ 8
	总量满足建库要求

B 类：样本为风险样本，该类型样本无法满足 A 类要求，但需同时不低于以标准。

B 类	RNA 样品澄清透明，无不溶物
	$Nc/Qc=0.95\sim 1.5$ 、 $A260/280=1.9\sim 2.2$ ， $A260/230 \geq 1.5$
	RIN 值 ≥ 6
	总量满足单次建库要求 50%

C 类：样本为不合格样本，该类型样本可能出现以下一种或几种情况，远低于标准。

C 类	DNA 样有不溶物，颜色
	$Nc/Qc > 1.5$ 、 $A260/280 < 1.9$ ， $A260/230 < 1.5$
	RIN 值小于 6
	总量少于单次建库要求 50%

四、DNA/RNA 样品等级说明

A：样品质量合格，满足建库测序要求。

B：样品质量不完全满足建库测序要求，可尝试风险建库。

C：样品质量不合格，不满足建库测序要求。

五、不同等级样品测序情况说明：

A 类：一次建库成功率较高。

B 类：存在建库失败、测序数据不够或者质量差的风险。

C 类：不建议建库上机，失败可能性很高。

六、DNA 样本风险可能存在的类型及情况说明：

对于 B 和 C 类样本，实验室根据经验会给出一些建议，但需提前和客户沟通所存在的风险。以下总结可能出现的结果，但并不以此作为数据承诺指标，仅做为一般性结果参考：

样本分类	风险类型	一般性结果			建库成功率
		数据量	N50	Q 值	
B 类	粘稠	70%	影响较小	影响较大	70%
	纯度不佳	60%	影响较小	影响较大	80%
	降解	80%	影响较大	影响较小	80%
	50%≤总量≤100%	70%	影响较小	影响较小	70%
C 类	非常粘稠	≤50%	影响较小	影响较大	无法预估
	纯度差	≤50%	影响较小	影响较大	无法预估
	降解	60%	影响较大	影响较小	无法预估
	总量≤50%	60%	影响较小	影响较小	无法预估

七、核酸需求量：

Nanopore 测序 DNA/RNA 需求量估算表

测序平台	项目类别	文库数量/个	DNA/RNA 用量 (ug)	数据产出 (Gb)
PromethION	动植物基因组	1	10	30-80
	真菌基因组	1	3	50-80
	细菌基因组	1	3	50-80
	宏基因组	1	3	30-80
	Direct RNA	1	50	1-5
	PCR-cDNA	1	5	30-80