

碧云天高通量测序服务介绍



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
高通量测序服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>

高通量测序技术

概况

- 高通量测序技术(High-throughput sequencing, HTS)又称下一代测序技术(Next-generation sequencing, NGS), 相对于传统的一代测序技术桑格测序(Sanger sequencing)而言, 高通量测序技术是一次能对几十万到几百万条核酸分子进行序列测定的技术。同时高通量测序使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能, 所以又被称为深度测序(Deep sequencing)。
- 高通量测序技术大约在2006-2007年左右进入中国市场, 当时有454、Illumina、ABI Solid等品牌, 后来由于技术优势, Illumina公司逐渐占据上风, 独领市场。目前, Illumina公司的HiSeq X 10和Nova-Seq等机型是市场的主流。另外ABI(现属Thermo Fisher)后来收购Ion Torrent的测序技术由于测序周期较短, 也占一定市场, 但由于相对通量较低, 成本比较高。近几年技术日趋成熟的还有第三代单分子测序技术, 其特点是测序前不用进行PCR扩增, 并且读长较长, 目前可达9kb以上, 其代表产商有Pacbio公司和Oxford Nanopore Technologies(ONT)。

高通量测序技术概况

技术流程

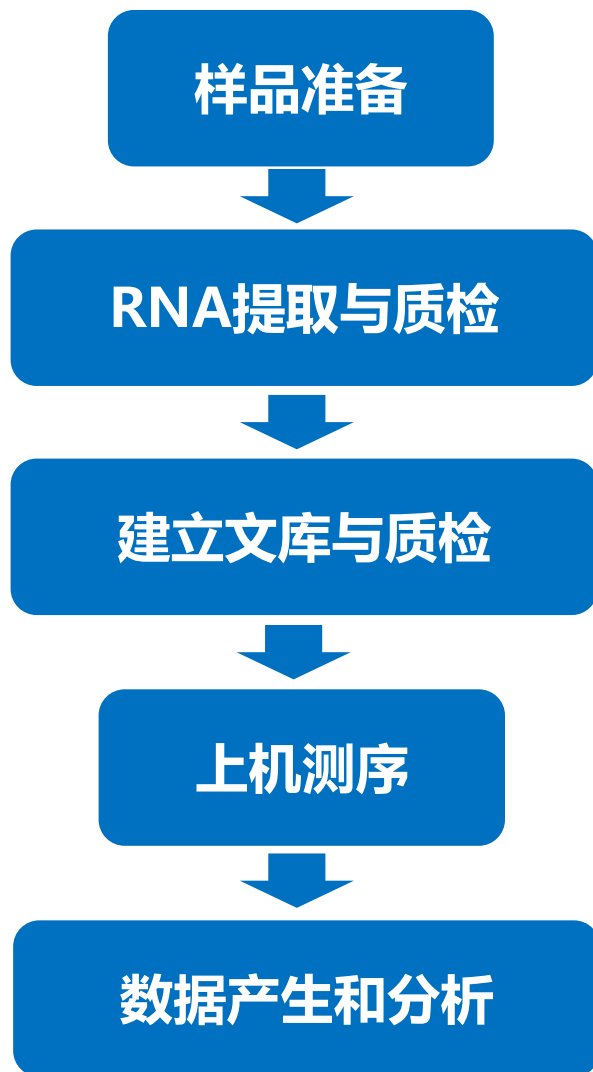


转录组测序

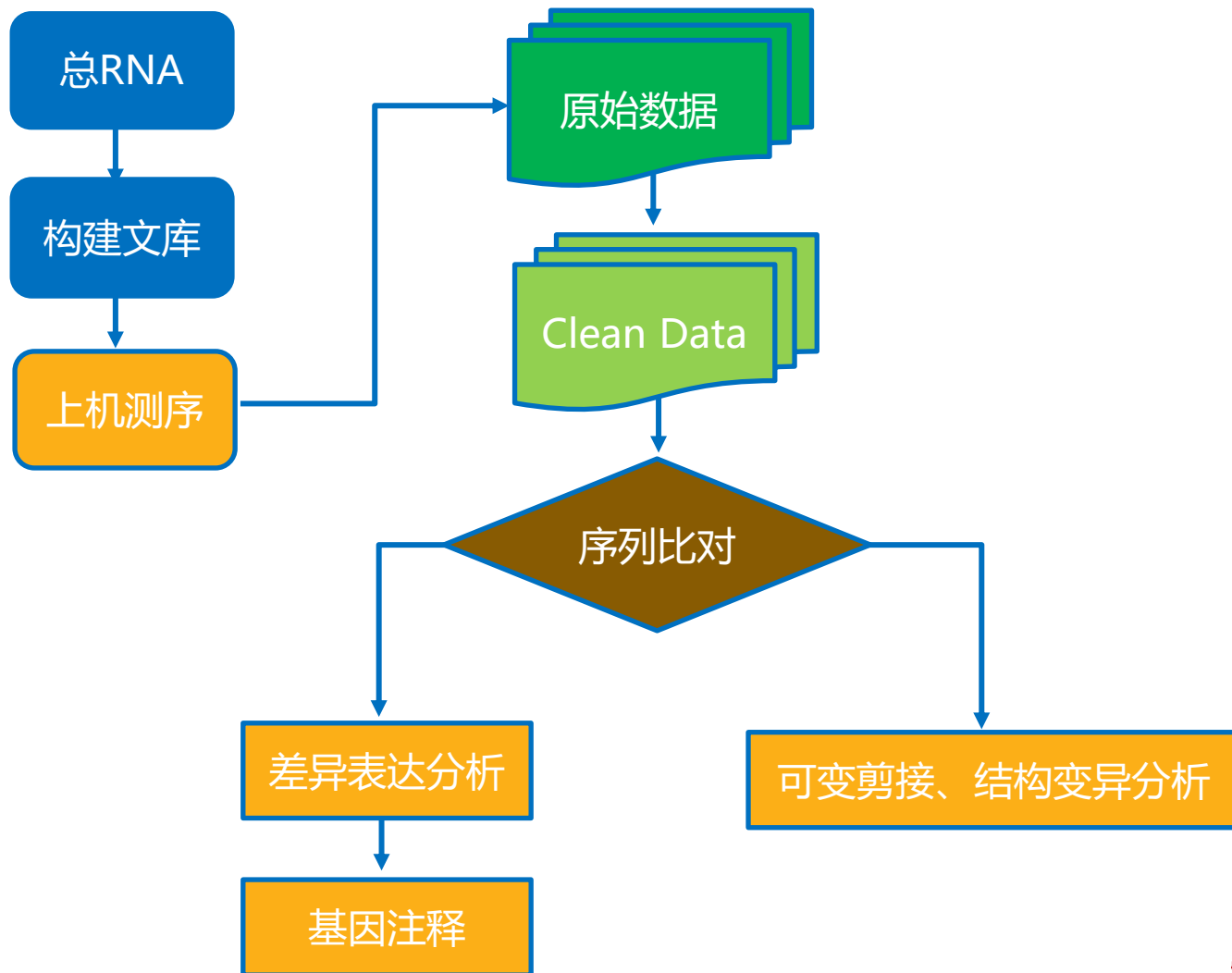
RNA-Seq

- 转录组测序RNA-Seq是基于二代测序技术的转录组学研究方法：首先提取生物样品的全部转录的RNA并进行mRNA富集，然后反转录为cDNA后进行的高通量测序，在此基础上进行片段的拼接组装，从而可得到一个的转录本，进而可以形成对该生物样品当前发育状态的基因表达状况的全局了解。
- 不同阶段或部位的生物样品的RNA-Seq转录组进行比较分析，则可以在转录层面得到基因表达水平的变化，针对关键基因则可以进行代谢通路(Pathway)的构建。

转录组测序 技术流程



转录组测序 技术流程



转录组测序

技术参数

- 测序平台与方式：HiSeq, PE150
- 测序数据量： ≥ 6 Gb/样本
- 测序加基础分析周期：20个工作日

转录组测序

样品要求

- 样本类型：total RNA，溶解于DEPC-水或者RNase-free的缓冲液中
- 样本总量： $\geq 2 \mu\text{g}$
- 样本浓度： $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- $\text{OD}_{260/280} \geq 2.0$ ；完整性 $\text{RIN} \geq 8.0$
- 样品运输：样品置于1.5 ml管中，封口膜封好，干冰运输

转录组测序

数据分析内容

- 1. Reads QC/QA
- 2. 比对到参考基因组
- 3. mRNA 表达水平分析
- 4. 基于mRNA 表达水平的QC
- 5. 基因差异表达分析；差异表达基因筛选
- 6. 差异表达基因的功能富集分析(GO,KEGG)
- 7. 差异表达基因的蛋白功能富集分析(Pfam, KOG等)
- 8. 差异表达基因PPI分析
- 9. 特定功能的基因的差异表达情况
- 10. 基因共表达分析
- 11. 可变剪切分析
- 12. 新转录本预测
- 13. SNP/InDel 分析
- 14. 融合基因分析

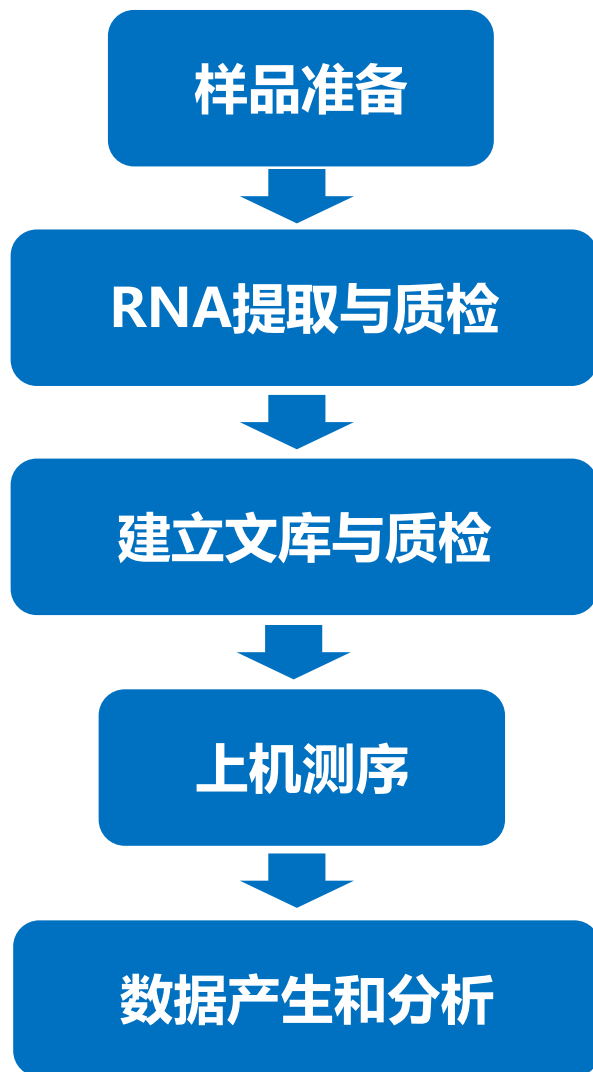
小RNA测序

Small RNA Sequencing

- Small RNA是一大类调控分子，几乎存在于所有的生物体中。Small RNA包括：miRNA、ncRNA、siRNA、snoRNA、piRNA、rasiRNA等。Small RNA有多种多样的作用途径，包括mRNA降解、翻译抑制、异染色质形成以及DNA去除，来调控生物体的生长发育和疾病发生。
- MicroRNA (miRNA)是一类内生的、长度约为20-24个核苷酸的小RNA，其在细胞内具有多种重要的调节作用。每个miRNA可以有多个靶基因，几个miRNA也可以靶向同一个基因。这种复杂的调节网络通过一个miRNA来调控多个基因的表达，也可以通过几个miRNA来精细调控某个基因的表达。

小RNA测序

技术路线



小RNA测序

技术参数

- 测序平台与方式：HiSeq, SE50
- 测序数据量：10-20M Reads/样本
- 测序加基础分析周期：20个工作日

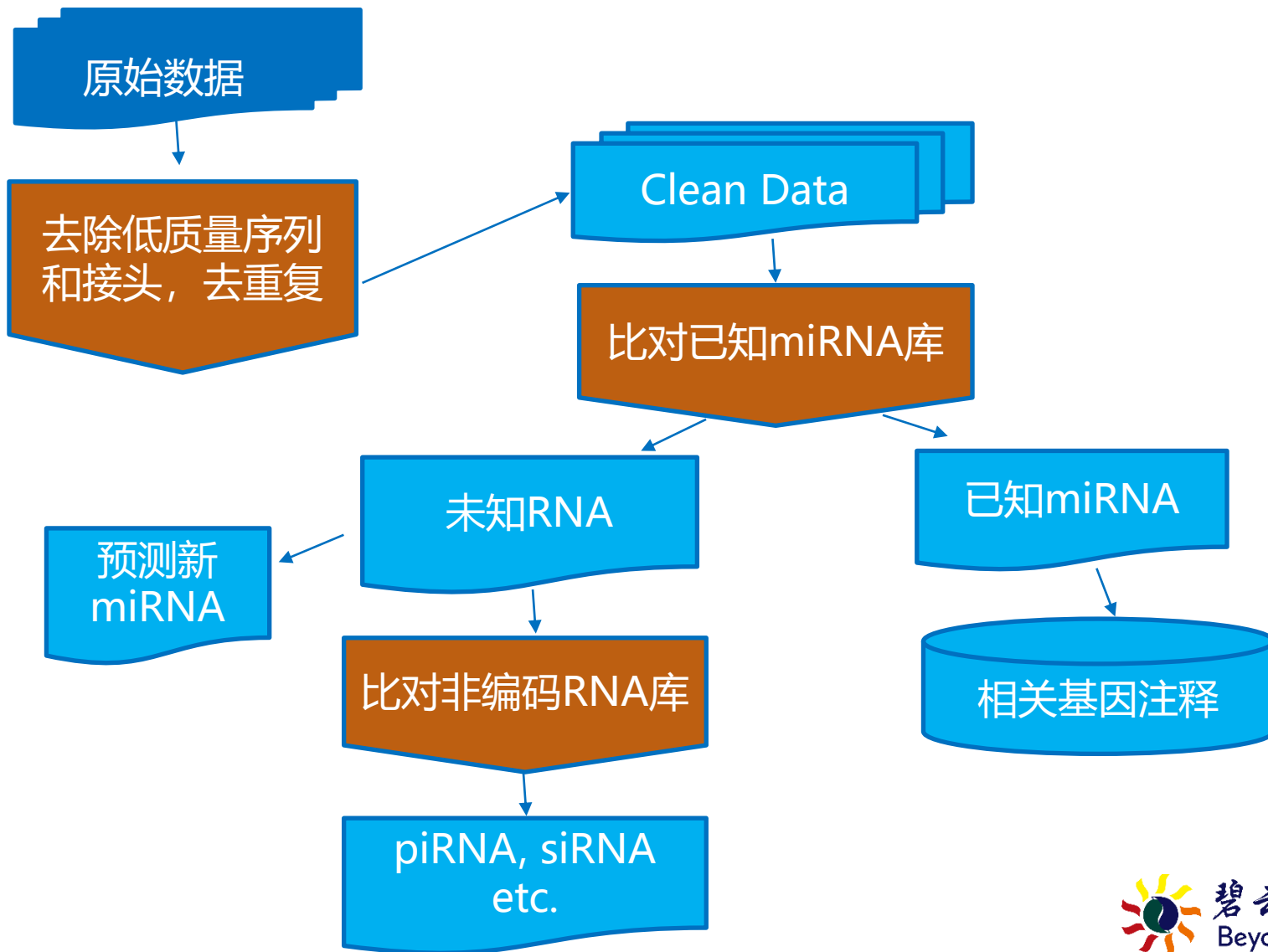
小RNA测序

样品要求

- 1. 样品类型：细胞、新鲜组织或RNA样品。
- 2. 样品量：细胞样品请提供至少 1×10^7 个细胞，组织样品请提供至少300mg的组织块或切片，RNA样品请提供2 μg 以上的总RNA。
- 3. 样品质量：RNA无明显降解，提取的总RNA OD260/280值在1.8~2.2之间，浓度 $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，28S:18S ≥ 1.5 ，RIN ≥ 7 。
- 4. 样品保存：细胞样品或新鲜组织块(切成~50mg的小块)可用TRIZOL或RNA保护剂处理或液氮冻存后， -80°C 保存。RNA样品可溶于乙醇或RNA-free的超纯水中， -80°C 保存。样品保存期间避免反复冻融。
- 5. 样品运输：样品置于1.5 ml管中，封口膜封好，干冰运输。

小RNA测序

数据分析流程



小RNA测序

数据分析内容

- 1. Reads QC/QA
- 2. 公共序列和特异序列的分析
- 3. 小RNA在选定的参考基因组上的分布
- 4. 已知miRNA筛选
- 5. 新miRNA预测
- 6. 分类注释
- 7. 靶基因预测
- 8. 靶向转录本分析

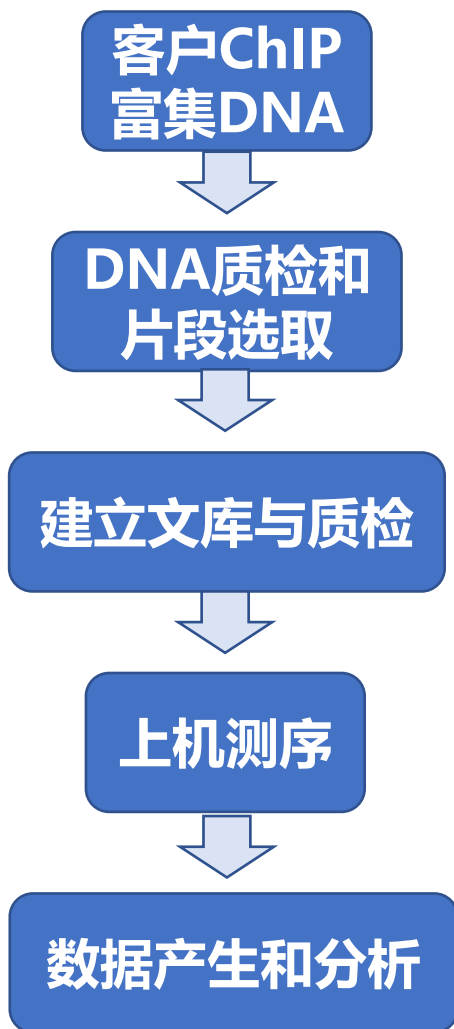
染色质免疫共沉淀测序

Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, ChIP-Seq

- 染色质免疫共沉淀技术(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)也称结合位点分析法，是研究体内蛋白质与DNA相互作用的有力工具，通常用于转录因子结合位点或组蛋白特异性修饰位点的研究。将ChIP与第二代测序技术相结合的ChIP-Seq技术，能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的DNA区段。
- 首先通过染色质免疫共沉淀技术（ChIP）特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段，并对其纯化与文库构建；然后对富集得到的DNA片段进行高通量测序。研究人员通过将获得的数百万条序列标签精确定位到基因组上，从而获得全基因组范围内与组蛋白、转录因子等互作的DNA区段信息。基于此，我们推出ChIP-Seq的完整解决方案，协助您一起探索生物奥秘。

染色质免疫共沉淀测序

技术路线



染色质免疫共沉淀测序

技术参数

- 测序平台与方式：HiSeq, PE150
- 测序数据量：建议5-6 Gb/样本(约30-40M Reads)
- 测序及基础分析周期：20个工作日

染色质免疫共沉淀测序

样品要求

- 1. DNA纯度：OD 260/280值应在1.8 ~ 2.0 之间;
- 2. DNA总量：每个样品总量不少于15ng;
- 3. DNA的保存溶剂：H₂O 或TE (pH 8.0)中;
- 4. 样品运输：冰袋运输，且在运输过程中请用parafilm将管口密封好，以防出现污染。
- 5. 建议在条件允许情况下，提供可供两次样品制备的量，以确保实验质量及延续性。

染色质免疫共沉淀测序

数据分析内容

- 1. 测序数据质量评估(QC)
- 2. 比对到参考基因组与数据统计
- 3. 基因组分布统计
- 4. Peak Calling分析
- 5. Peak顺式调控元件分布
- 6. Peak区域基因注释
- 7. Peak差异分析
- 8. 转录结合位点的Motif分析(仅针对转录因子)
- 9. Peak靶基因功能注释：GO基因本体注释分析
- 10. Peak靶基因功能注释：Pathways生物信号通路分析

谢谢!



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线: 400-168-3301或800-8283301
技术咨询: info@beyotime.com
高通量测序服务: service@beyotime.com
网址: <http://www.beyotime.com>