

**【有勁生物科技】**  
科學研究 定序委託單附件

附件一、Library 類型服務列表

定序類型	sample type	library program
DNA sequencing	Genomic DNA	Whole genome library
		PCR free whole genome library
		Human exome library
	Metagenomic	16S metagenomic library
		Whole genome library
	Plasma DNA	Plasma DNA library
	PCR Amplicon	Amplicon without fragmentation library (PCR free)
		Amplicon with fragmentation library
定序類型	sample type	library program
Small RNA sequencing	total RNA	Small RNA library
	Small size RNA (< 200 nt)	
定序類型	sample type	library program
RNA sequencing	total RNA	Poly-A mRNA library
		Strand specific Poly-A mRNA library
		rRNA depletion RNA library
		Strand specific rRNA depletion RNA library

## 【有勁生物科技】

### 科學研究 定序委託單附件

附件二、定序服務樣品需求列表 (建議採用 Invitrogen 的 Qubit 螢光定量方式，因 Nanodrop 可能會高估樣品量。)

Library 類型	Whole genome library/Metagenomic library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genomic DNA 2 µg 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 10 ng/µL。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>5. 經 0.6% Agarose gel 確認 DNA 沒有降解的現象，且沒有明顯的 RNA 汙染。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 250-350 bp</b>  <b>PCR cycle: 8</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 有勁會依照樣品片段化的狀況，在 insert size 200-350 bp 範圍內，選一個區域做切膠，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> <li>• 若要求特定 insert size，需額外加收費用，insert size 選擇範圍需落在 180-500 bp，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議回溶於 TE buffer。</li> <li>• 樣品建議用 Phenol / Chloroform 萃取，並用酒精多次清洗。</li> </ul>
Library 類型	PCR free whole genome library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genomic DNA 10 µg 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 25 ng/µL。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>5. 經 0.6% Agarose gel 確認 DNA 沒有降解的現象，且沒有明顯的 RNA 汙染。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 200-350 bp</b>  <b>PCR cycle: 0</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 有勁會依照樣品片段化的狀況，在 insert size 200-350 bp 範圍內，選一個區域做切膠，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> <li>• 若要求特定 insert size，需額外加收費用，insert size 選擇範圍需落在 180-350 bp，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議回溶於 TE buffer。</li> <li>• 樣品建議用 Phenol / Chloroform 萃取，並用酒精多次清洗。</li> </ul>
Library 類型	Human exome capture library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genomic DNA 2 µg 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 10 ng/µL。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>5. 經 0.6% Agarose gel 確認 DNA 沒有降解的現象，且沒有明顯的 RNA 汙染。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 200-300 bp</b>  <b>PCR cycle: 8 (before capture) 與 18 (after capture)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 無法要求其他 insert size。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議回溶於 TE buffer。</li> <li>• 樣品建議用 Phenol / Chloroform 萃取，並用酒精多次清洗。</li> </ul>
Library 類型	16S Metagenomic library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DNA 總量 100 ng 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 5 ng/µL。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.0</li> <li>5. 經 0.6% Agarose gel 確認 DNA 沒有降解的現象，且沒有顯著的 RNA 汙染。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 等同 PCR amplicon size</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1<sup>st</sup>-step PCR : cycles: 25，或應顧客需求調整。</li> <li>2. 2<sup>nd</sup>-step PCR : cycles: 8。</li> </ol>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議回溶於 nuclease-free water。</li> </ul>

**【有勁生物科技】**  
科學研究 定序委託單附件

Library類型	Plasma DNA library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>DNA 總量 10 ng 以上。</li> <li>濃度需大於 0.2 ng/μL。</li> </ol>
Library 製備資訊	<b>Insert size range: 等同 Plasma DNA size</b> <b>PCR cycle: 4+16</b>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>樣品建議回溶於 TE buffer。</li> </ul>
Library類型	PCR amplicon without fragmentation library (PCR free)
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>PCR amplicon 1 μg 以上。</li> <li>濃度需大於 5 ng/μL。</li> <li>PCR amplicon 長度需在 100 bp-500 bp 之間。</li> <li>260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>經 1.5% Agarose gel 確認 amplicon 大小在 100 bp-500 bp 之間，且沒有其他非專一片段。</li> </ol>
Library 製備資訊	<b>Insert size range: 等同 PCR amplicon size</b> <b>PCR cycle: 0</b>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>樣品建議經過切膠純化，以去除非專一性產物。</li> <li>樣品建議回溶於 nuclease-free water。</li> </ul>
Library類型	PCR amplicon with fragmentation library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>PCR amplicon 2 μg 以上。</li> <li>濃度需大於 10 ng/μL。</li> <li>260/280 ratio : 1.8-2.0</li> <li>260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>經 Agarose gel 可確認 amplicon 在目標大小之間，且沒有其他非專一片段。</li> </ol>
Library 製備資訊	<b>Insert size range: 250-350 bp</b> <b>PCR cycle: 8</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>有勁會依照樣品片段化的狀況，在 insert size 200-350 bp 範圍內，選一個區域做切膠，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> <li>若要求特定 insert size，需額外加收費用，insert size 選擇範圍需落在 180-500 bp，誤差範圍會在±50 bp 內。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>樣品建議經過切膠純化，以去除非專一性產物。</li> <li>樣品建議回溶於 nuclease-free water。</li> </ul>

**【有勁生物科技】**  
科學研究 定序委託單附件

Library 類型	Small RNA library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Total RNA 10 <math>\mu</math>g 以上或 small size RNA (&lt; 200 nt) 100 ng 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 200 ng/<math>\mu</math>L。small size RNA (&lt; 200 nt) 濃度需大於 10 ng/<math>\mu</math>L。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.9-2.1</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>5. 經 1% Formaldehyde-agarose gel 確認 RNA 沒有降解的現象，28S rRNA 在 4.5 k nt 的量約為 18S rRNA 在 1.9 k nt 的 2 倍。</li> <li>6. 樣品需回溶於 nuclease-free water。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 18-30 nt</b> <b>PCR cycle: 15</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 有勁會取 18-30 nt 範圍的 RNA 進行 library 製備，確切膠範圍，可能會受樣品 retardation 的影響，且不同種類的 small RNA 電泳速率也會稍有差異，因此在切膠邊緣的部分 18-19 nt 與 28-30 nt 的精準度會有不穩定性存在。若需擴大切膠範圍需事先告知，但此相對而言，非 small RNA 的產物也將會提高。</li> <li>• 若對於切膠範圍有特殊需求，請事先告知業務人員，以便回覆客戶其可行性和風險。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議用 BioRad Experion 或 Agilent Bioanalyzer 測量，其 RIN (RNA Integrity Number) <math>\geq</math> 8。</li> </ul>
Library 類型	mRNA library and Strand specific RNA library
樣品需求	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Total RNA 5 <math>\mu</math>g 以上。</li> <li>2. 濃度需大於 50 ng/<math>\mu</math>L。</li> <li>3. 260/280 ratio : 1.9-2.1</li> <li>4. 260/230 ratio &gt; 1.7</li> <li>5. 經 1% Formaldehyde-agarose gel 確認 RNA 沒有降解的現象，28S rRNA 在 4.5 k nt 的量約為 18S rRNA 在 1.9 k nt 的 2 倍。</li> <li>6. 樣品需回溶於 nuclease-free water。</li> </ol>
Library 製備資訊	<p><b>Insert size range: 180-250 bp</b> <b>PCR cycle: 15</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 有勁會將 insert size 180-250 bp 的產物純化出來，一般而言 major size 會落在 180-200 bp 左右。</li> <li>• 對於大部分樣品而言，strand specific 的效率可以達到 90% 以上。但是少部分樣品，則無法達到此標準。</li> </ul>
建議	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品建議用 BioRad Experion 或 Agilent Bioanalyzer 測量，其 RIN (RNA Integrity Number) <math>\geq</math> 8。</li> <li>• 樣品建議用 DNase 處理。</li> </ul>