版本号：202412V01

NGS cfDNA Library Quantification Kit for Illumina

NGS cfDNA文库定量试剂盒（Illumina）

目录号： CW2679S（1 mL）
CW2679M（5 mL）

保存条件： -20℃，如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW2679S 1 mL	CW2679M 5 mL
2×SYBR qPCR MasterMix	1 mL	5×1 mL
qPCR Primer Mix	100 μL	500 μL
DNA Standard A	100 μL	500 μL
DNA Standard B	100 μL	500 μL
DNA Standard C	100 μL	500 μL
DNA Standard D	100 μL	500 μL
DNA Standard E	100 μL	500 μL
50×High ROX	40 μL	200 μL

产品简介

本产品是针对cfDNA的染料法（SYBR Green I）qPCR NGS文库定量试剂盒，提供了qPCR过程所需的反应混合液，DNA引物混合物、标准品以及样品稀释液，试剂体系完整，操作简单方便。反应混合物中所含的荧光染料SYBR Green I 可以与所有的双链DNA结合。本试剂盒使用的是一种经化学修饰的全新高效热启动聚合酶，酶的激活需在95℃下孵育10 min。该产品特异性强、扩增效率高，试剂盒中的标准品长度（约270 bp）与cfDNA NGS文库的平均长度（250-300 bp）相当，能够对构建的cfDNA文库浓度进行快速准确的定量。

ROX染料用于校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差，一般用于ABI、Stratagene等公司的Real Time PCR扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同，因此ROX染料的浓度必须与相应的荧光定量PCR仪相匹配。

不需要ROX校正的仪器： Roche LightCycler 480, Roche LightCyler 96, Bio-rad iCyler iQ, iQ5, CFX96等。

需要Low ROX校正的仪器： ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio® 3 System, QuantStudio® 5 System， QuantStudio® 6 Flex System, QuantStudio® 7 Flex System, ViiA 7 system， Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000等。

需要High ROX校正的仪器： ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等。

注意：High Rox和Low Rox 的配制方法见使用方法2中说明。

适用范围

本产品是针对Illumina平台二代测序文库浓度绝对定量而设计。文库末端包含Illumina P5和P7芯片结合序列，长度不超过1 kb，浓度不低于0.02 pM即可使用本品进行定量实验。试剂盒提供的qPCR Primer Mix中包含如下两种引物序列：

Primer 1: 5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA-3'

Primer 2: 5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA-3'

可预先通过引物序列确认文库是否可以被该引物对扩增。

使用方法

1. 扩增模板准备

   将待检测文库样品用TE (10 mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释，稀释后浓度尽量在0.01-60 pM之间。4℃冰上放置备用。

2. qPCR反应体系配制

   配制前预先将所需的冷冻保存试剂完全融化并多次颠倒混匀，然后短暂离心后备用。20 μL的基础反应体系如下:

试剂	20 μL反应体系
2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL
qPCR Primer Mix	0.8 μL
Template	4 μL
ddH_2O	5.2 μL

说明: High Rox机型: 每50 μl反应体系加入1 μL High Rox;

Low Rox机型: 每500 μl反应体系加入1 μL High Rox。

根据需要配出足够量的反应体系混合物，混匀后按每孔16 μL体积加入至反应孔中，空白对照加入同样体积的TE，再将准备好的标准品和稀释的样品加入至对应反应孔中，加入量为4 μL/孔。推荐使用20 μL反应体系，如需进行更小体系反应，将体系各组分等比减少即可。

3. qPCR反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95℃	10 min	1
变性	95℃	10 sec	40
退火/延伸	62℃	30 sec	

1) 如文库平均长度大于700 bp，应适量增加退火/延伸时间。

2) 溶解曲线参照具体仪器设定程序。

数据分析

1. 标准曲线制作

   照数据处理Excel表绘制标准曲线。标准曲线相关系数R^2应不低于0.99，以Ct值为纵坐标时，斜率应位于-3.1与-3.6之间，如标准曲线参数不合理，建议重复实验。

DNA Standard名称	DNA Standard浓度
DNA Standard A	60 pM
DNA Standard B	6 pM
DNA Standard C	0.6 pM
DNA Standard D	0.06 pM
DNA Standard E	0.006 pM

2. 文库浓度计算

   实验三个复孔间的Ct差异应不超过0.2，否则需删除无效数据或重复实验，请勿使用标准曲线有效Ct范围外的Ct计算稀释文库的浓度。具体文库浓度计算方法请参见本产品的数据处理Excel。

注意事项

1. 在试验前，应详细阅读本说明。应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作。
2. 使用请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
3. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 配制反应液时，请使用新的或者无污染的枪头和离心管，尽量防止污染。