



# NGS Library Quantification Kit for Illumina

## NGS文库定量试剂盒（Illumina）

目录号：CW2684S（1 mL）

CW2684M（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	CW2684S 1 mL	CW2684M 5 mL
2×SYBR qPCR Master Mix	1 mL	5×1 mL
qPCR Primer Mix	100 μL	500 μL
DNA Standard 1	100 μL	500 μL
DNA Standard 2	100 μL	500 μL
DNA Standard 3	100 μL	500 μL
DNA Standard 4	100 μL	500 μL
DNA Standard 5	100 μL	500 μL
50×High ROX	40 μL	200 μL

## 产品简介

本产品是采用染料法 (SYBR Green I) 对NGS建库后的产物进行实时荧光定量PCR (qPCR)。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, 试剂体系完整, 操作简单方便。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°C下孵育10 min。该产品特异性强, 扩增效率高, 能够对构建的文库浓度进行快速准确的定量。适用于无需ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪, 如Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-radiCycleriQ, iQ5, CFX96。

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 LightCycler 96, Bio-radiCycler 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 StepOne/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0.002 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。

## 操作流程

### 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 0.01-20 pM之间。4°C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  $\mu$ L 的基础反应体系如下:

试剂	20 $\mu$ L反应体系
2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix	10 $\mu$ L
qPCR Primer Mix	0.8 $\mu$ L
Template	4 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	5.2 $\mu$ L

**注意: High Rox机型: 每50  $\mu$ L反应体系加入1  $\mu$ L High Rox ;**

**Low Rox机型: 每500  $\mu$ L反应体系加入1  $\mu$ L 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  $\mu$ L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  $\mu$ L/孔。推荐使用20  $\mu$ L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°C	10 min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火/延伸	62°C	30 sec	
溶解曲线分析	65-95°C		

1) 退火温度请以60-64°C作为设定范围的参考, 发生非特异性反应时, 可提高退火温度。

2) 如文库平均长度大于700 bp, 应适量增加退火/延伸时间。

## 操作流程

### 1. 标准曲线制作

使用有效范围内的Ct值绘制标准曲线。标准曲线相关系数R2应不低于0.99，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 1	20 pM
DNA Standard 2	2 pM
DNA Standard 3	0.2 pM
DNA Standard 4	0.02 pM
DNA Standard 5	0.002 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，应仔细阅读本说明。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。