



NGS Library Quantification Kit for Ion torrent NGS文库定量试剂盒 (Ion torrent)

目录号：CW2680S (1 ml)
CW2680M (5 ml)

保存条件：-20℃，12个月，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	CW2680S	CW2680M
2×SYBR qPCR Master Mix 1	1 ml	5 ml
qPCR Primer Mix 1	100 μl	500 μl
DNA Standard I	100 μl	500 μl
DNA Standard II	100 μl	500 μl
DNA Standard III	100 μl	500 μl
DNA Standard IV	100 μl	500 μl
DNA Standard V	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；使用的GoldStar Taq DNA Polymerase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，能够对构建的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 LightCycler 96, Bio-rad iCycler 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：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Ion torrent平台二代测序文库浓度绝对定量而设计。文库末端包含Ion torrent P5和P7芯片结合序列，长度不超过1kb，浓度不低于0.005pM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'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TC - 3'

Primer 2: 5'-CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT-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0.05-50 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 Master Mix 1	10 µl
qPCR Primer Mix 1	0.8 µl
Template	4 µl
ddH ₂ O	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	
溶解曲线分析	65-95℃		

- 1) 退火温度请以60-64℃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。

数据分析

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 R^2 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 I	50 pM
DNA Standard II	5 pM
DNA Standard III	0.5 pM
DNA Standard IV	0.05 pM
DNA Standard V	0.005 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头枪头和离心管，尽量防止污染。