

TransNGS® Library Quantification Kit for Illumina® 文库定量试剂盒 适配illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KQ101

版本号: Version 2.0

保存: 在-18℃及其以下温度下避光保存一年。

产品说明

本试剂盒利用qPCR方法精确定量Illumina测序平台不同GC含量的二代测序文库。其中qPCR预混液采用全封闭法TransStart® TipTaq新型热启动酶, 并包含新型EvaGreen荧光染料、dNTPs、PCR增强剂、PCR稳定剂以及针对文库定量特别优化的反应缓冲液, 具有灵敏度高、特异性强、扩增能力强、适用范围广、稳定性好等特点, 适用于不同GC含量以及长片段文库的定量检测。

特点

- 线性标准品, 定量更精确。
- 特异性强, 只扩增双端接头完整的文库分子。
- 操作简便, 直接使用预先稀释好的标准品, 包含绝对定量所有必需组分。
- 扩增效率与灵敏度高, 特别优化的qPCR体系与程序。
- 适用范围广, 可扩增富含GC/AT的模板。
- 兼容性好, 配有适用于不同机型的Passive Reference Dye, 兼容所有主流qPCR仪器。
- 新型EvaGreen荧光染料, 信号更强、更稳定。

适用范围

Illumina测序平台不同GC含量的二代测序文库, 文库末端包含Illumina P5和P7芯片结合序列、片段长度不超过1 kb且文库浓度不低于0.0002 pM。

试剂盒组成

Component	KQ101-01 (100 rxns)	KQ101-02 (500 rxns)
TransNGS® Library Quantification qPCR SuperMix (2×)	1 ml	5×1 ml
Library Quantification Primer Mix (20×)	100 µl	500 µl
50% GC DNA Standards (S1-S6)	24 µl each	120 µl each
Library Dilution Buffer (10×)	1 ml	5 ml
Passive Reference Dye (50×)	40 µl	200 µl
Nuclease-free Water	10 ml	50 ml

- 50% GC DNA Standards (S1-S6)包含6个浓度梯度 (S1-S6) (表1)。

表1 标准品的浓度与拷贝数

DNA标准品	S1	S2	S3	S4	S5	S6
摩尔浓度 (pM)	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002
拷贝数	12×10^6	12×10^5	12×10^4	12×10^3	12×10^2	12×10^1



操作流程

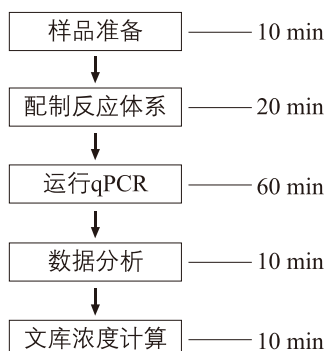


图1 不同GC含量的二代测序文库qPCR定量操作流程

1、样品准备

- (1) 彻底化冻并充分混匀试剂，短暂离心后，置于冰上备用，用完后立即放回-20℃保存。
- (2) 根据待定量文库数量（一个文库一般准备300 μ l 1 $\times$ Library Dilution Buffer），按照比例使用Nuclease-free Water把10 $\times$ Library Dilution Buffer稀释为1 $\times$ Library Dilution Buffer，充分混匀后备用。未用完的1 $\times$ Library Dilution Buffer可放置于2-8℃短期保存（一周）。
- (3) 根据待定量DNA文库的大致质量浓度（赛默飞Qubit荧光定量仪检测结果），使用1 $\times$ Library Dilution Buffer进行适度稀释，请勿使用水作为稀释液。由于文库浓度不同，最佳稀释倍数不尽相同，一般推荐稀释度为1/1000-1/100000，推荐进行多次小体积稀释（例如：1 μ l 文库+99 μ l 1 $\times$ Library Dilution Buffer），避免大体积一次性稀释，并且至少设置一个额外的2倍稀释。例如：质量浓度范围1-10 ng/ μ l的DNA文库一般建议稀释到1/10000和1/20000这两个稀释度，确保在标准曲线范围之内（详见表1）。文库应现用现稀释，一定要准确稀释以减少稀释造成的定量误差，稀释好后置于冰上备用。

2、配制qPCR体系

根据所有样品（标准品、文库、NTC）数量，按照表3配制除模板外的预混液（共16 μ l/孔），做好平行孔（建议每个样3个）以及NTC（1 $\times$ Library Dilution Buffer），充分混匀后在PCR板或者八连管中每孔准确加入16 μ l预混液。最后分别加入4 μ l的1 $\times$ Library Dilution Buffer（NTC）、低浓度到高浓度（S6-S1）标准品、稀释好的文库作为模板，充分混匀并简单离心后放入qPCR仪器中。

表3 推荐qPCR体系

Component	Volume
TransNGS® Library Quantification qPCR SuperMix (2 $\times$)	10 μ l
Library Quantification Primer Mix (20 $\times$)	1 μ l
Passive Reference Dye (50 $\times$) (optional)	-/0.4 μ l
Nuclease-free Water	5 or 4.6 μ l
DNA Standard/Library	4 μ l
Total volume	20 μ l

- 为避免体系污染，建议文库稀释、配制预混液、加模板这三个步骤分别在3个物理隔离的不同区域进行操作。
- 建议按照NTC、低浓度到高浓度标准品、稀释好的文库的顺序在反应体系中加入模板。
- 建议所有操作在冰上进行，加样后一定要充分混匀，离心后再放入qPCR仪器中。



- 由于移液过程可能产生误差，需要多准备至少2个孔的预混液。例如：如果是10个文库，每个文库做2个稀释度，加上6个标准品以及1个NTC，每个样3个平行，则共有 $(10 \times 2 + 6 + 1) \times 3 = 81$ 个孔，建议准备83个孔的预混液。一般一块96孔板可以同时检测12个文库。
- 推荐20 μ l反应体系，如用10 μ l反应体系，可将体系各组分等比例减少即可。
- 根据qPCR仪器机型选择Passive Reference Dye。

3、推荐qPCR条件

按照下面程序进行qPCR，可以选择两步法或者三步法。

qPCR (两步法)

95°C	5 min	
95°C	25 sec	} 35 cycles
60°C	45 sec	
Dissociation Stage		

qPCR (三步法)

95°C	5 min	
95°C	20 sec	} 35 cycles
60°C	20 sec	
72°C	30 sec	
Dissociation Stage		

- 请使用"EvaGreen"或者"SYBR Green"通道进行信号采集。
- 常规文库(中等GC含量、平均长度小于700 bp) 推荐两步法。
- 对于偏高或者偏低GC含量的文库，推荐三步法。
- 对于平均长度大于700 bp的文库，推荐三步法，并且延长延伸时间不超过50秒。
- 不同仪器熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认程序即可。

Passive Reference Dye适用机型

- Passive Reference Dye I (50 $\times$)
ABI Prism 7000/7300/7700/7900, ABI Step One, ABI Step One Plus, ABI 7900HT, ABI 7900HT Fast
- Passive Reference Dye II (50 $\times$)
ABI Prism 7500, ABI Prism 7500 Fast, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA 7, Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000
- No Passive Reference Dye
Roche LightCycler 480, Roche Light Cyclers 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CFX96, Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercycler ep realplex

4、数据分析

根据复孔间Ct值差异 ≤ 0.3 的原则，对DNA Standards (S6-S1) 原始Ct值进行过滤，并计算平均Ct值。

参照NTC阴性对照的Ct值确认标准曲线Ct值有效范围，确保相邻一组标准品间的 Δ Ct值在3.1-3.6之间，并且NTC比最低浓度的标准品的Ct值大于3以上，使用有效范围内的Ct值 (作为纵坐标) 和表4对应Log[pM] (作为横坐标) 制作标准曲线。制作的标准曲线相关系数 R^2 应不低于0.99，斜率应位于-3.1 ~ -3.6之间 (表示扩增效率位于90% ~ 110%之间)。

- 为了确保文库定量准确，请至少使用4个Ct (DNA Standards) 制作标准曲线。
- 如Ct (NTC) > Ct (S6) + 3，则最大有效Ct值为Ct (S6)，应使用DNA Standard S1-S6所产生的Ct值制作标准曲线。
- 如果Ct (S6) + 3 > Ct (NTC)，而Ct (S6) - Ct (S5) 在3.1-3.6之间，可以舍弃S6，使用DNA Standard S1-S5制作标准曲线，并按照要求评估标准曲线的质量。
- 如果Ct (S5) + 3 > Ct (NTC)，提示定量体系存在严重污染，需更换体系中所有组分后重复实验。
- 如果标准曲线参数不佳，超出了有效范围，建议重新进行文库定量。



表4 标准曲线制作

DNA标准品	S1	S2	S3	S4	S5	S6
摩尔浓度 (pM)	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002
Log[pM]	Log[20]	Log[2]	Log[0.2]	Log[0.02]	Log[0.002]	Log[0.0002]

5. 计算文库浓度

采用绝对定量方法，根据标准曲线方程，计算出文库的初测浓度（一般qPCR仪器都可以分析直接获得）。由于荧光染料结合DNA后产生的荧光强度与DNA分子长度成正比，需要进一步根据标准品的长度（420 bp）和DNA文库平均长度（生物分析仪检测结果）对文库摩尔浓度进行校正，并根据稀释度计算出文库的初始浓度，最后一般取两个稀释度测定结果的平均值作为文库的初始浓度。

校正后的稀释文库浓度(pM) = [420 bp/文库平均长度(bp)] × 稀释文库的初测浓度(pM)

初始文库浓度(nM) = 校正后的稀释文库浓度(pM) × 稀释倍数/1000

- 稀释文库的Ct值只有位于标准曲线有效Ct值范围内才可用于浓度计算。请勿使用标准曲线有效Ct值范围之外的Ct值计算稀释文库的浓度。
- 为了减少文库稀释以及实验操作引起的误差，一般建议测定同一文库的2个不同稀释度浓度，然后取平均值作为初始文库浓度。

注意事项

- 本试剂盒只针对Illumina测序平台末端包含Illumina P5和P7芯片结合序列的文库。
- 试剂使用前一定要在冰上彻底化冻确保充分混匀后再使用。
- PCR因操作不当极易产生污染，进而导致定量结果不准确、可信度不高等问题。建议将反应体系配制区和模板制备区进行物理隔离，使用专用移液器以及带滤芯的枪头，并定时对各实验区域进行清洁。严格按照qPCR要求进行操作，避免产生交叉污染，避免体系污染和NTC的非特异性扩增。
- 文库稀释一定要使用1×Library Dilution Buffer进行梯度稀释，现用现稀释，确保准确稀释并且充分混匀，稀释好的文库应置于冰上备用。
- 文库必须稀释至标准曲线有效Ct值范围内进行定量，可参照以往经验或使用其它测定方式测定的浓度作为参考进行稀释。
- 熔解曲线在分析NTC阴性对照污染程度以及确认标准曲线最大有效Ct值和文库特异扩增时至关重要，每次实验都需要进行熔解曲线采集步骤。
- 每次实验都需要平行设置NTC阴性对照，利用熔解曲线进行扩增特异性和体系污染程度分析。因Library Quantification Primer Mix引物序列为Illumina平台固定序列而非qPCR专用引物序列，且反复进行文库稀释定量时气溶胶污染无法完全避免，故NTC阴性对照反应出现扩增进而产生Ct值难以避免。
- 反应体系模板加入步骤中，建议先加1×Library Dilution Buffer作为NTC，然后按照从低浓度至高浓度的顺序（S6至S1）加入DNA Standards，最后加入稀释好的待测文库，每次移液都应更换新的带滤芯的枪头，以避免气溶胶污染。
- 因标准品S1的摩尔浓度远高于常规qPCR模板，其Ct值往往非常小（5~8）。而大部分qPCR仪器都默认将3-15循环设置为基线(Baseline)，有时会造成S1的Ct值错误增高，进而影响标准曲线的线性关系，手动设置基线为1-3循环可以有效避免这种情况发生。
- 严格参照NTC阴性对照Ct值确认标准曲线Ct值有效范围，基于定量准确性考虑对标准品进行取舍，确保NTC比标准曲线中的最低浓度标准品的Ct值大于3以上，并且至少使用4个DNA Standards Ct值制作标准曲线。如果Ct (S5) + 3 > Ct (NTC)，提示qPCR定量体系存在严重污染，需更换体系中所有组分后重复实验。
- 根据qPCR仪器机型选择Passive Reference Dye。



常见问题分析

问题	可能原因	解决方案
扩增效率偏出90%-110%范围	如Ct (NTC)-Ct (DNA Standard 6) < 3或者Ct (DNA Standard 6) - Ct (DNA Standard 5) < 3.1, 且扩增效率超过100%, 提示反应体系有污染	应根据NTC阴性对照的熔解曲线确认污染源(文库污染或DNA Standards污染或者Mix污染), 专用的qPCR区域操作, 避免污染
	不恰当的基线(Baseline)设置会增大Ct (DNA Standard 1), 进而影响扩增效率计算	手动调整基线(Baseline)为1-3循环
	移液精确度差, 未充分混匀	充分混匀, 使用专用的移液枪准确分样
标曲扩增曲线分布不均一	Ct (DNA Standard 6)-Ct (DNA Standard 5) < 3.1, 提示反应体系有污染	应根据NTC阴性对照的熔解曲线确认污染源(文库污染或DNA Standards污染或者Mix污染), 专用的qPCR区域操作, 避免污染
	Ct (DNA Standard 2) - Ct (DNA Standard 1) < 3.1, 提示基线(Baseline)设置不当	手动调整基线(Baseline)为1-3循环
	DNA Standards之间的 $\Delta Ct > 3.6$, 提示扩增效率差	确认所有试剂在使用前都已充分解冻并彻底混匀, 确认所有组分浓度正确以及反应程序无误
	长时间强光照射会导致qPCR SuperMix荧光值下降, 进而造成 $\Delta Ct > 3.6$	应按照推荐方式避光贮存试剂
$R^2 < 0.99$, 复孔重复性差	移液精确度差	使用专用的移液枪准确分样
	试剂未充分混匀或者保存不当	所有试剂在使用前应彻底化冻并充分混匀
	仪器相关问题	确认所用Passive Reference Dye与qPCR仪器匹配
DNA Standards有扩增, 而文库没有或Ct值很大	文库接头序列错误	核对文库末端序列与试剂盒提供的引物序列是否匹配
	稀释度过高	减少稀释倍数, 重复实验
	文库可能有降解	文库应现用现稀释, 稀释好的文库应置于冰上备用, 用完丢弃
稀释文库Ct值超过标准曲线有效Ct值范围	Ct (稀释文库) < Ct (DNA Standard 1), 提示文库稀释度不够, 多见于过度扩增的文库	提高文库稀释倍数重复实验
	Ct (稀释文库) > Ct (DNA Standard 6), 提示文库稀释度过高或构建失败	减少稀释倍数重复实验
文库各稀释度 ΔCt 值与稀释倍数差异不一致, 或者计算文库浓度差异超过10%	移液精确度差	使用专用的移液枪准确分样
	所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀	所有试剂在使用前应彻底化冻并充分混匀
	文库难于扩增	GC/AT含量过高或长度超过1 kb的文库扩增效率较差, 定量波动性大
	文库可能有降解	文库应现用现稀释, 稀释好的文库应置于冰上备用, 用完丢弃
DNA Standard 1 Ct值异常	不恰当的基线(Baseline)设置会增大Ct (DNA Standard 1)	手动调整基线(Baseline)为1-3循环
	仪器相关问题	确认所用Passive Reference Dye与qPCR仪器匹配





品质高于一切
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202502

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

北京全式金生物技术股份有限公司

🌐 www.transgen.com

✉ trans@transgen.com

☎ +86-400 898 0321

📍 北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

