



NGSquant™ Library qPCR Kit for Illumina®

适用于Illumina 二代测序平台的文库定量试剂盒

产品货号：QP100（500 次反应）

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：www.genecopoeia.com

www.igenebio.com

产品说明书

NGSquant™ Library qPCR Kit for Illumina®

I. 产品介绍

II. 产品应用

III. 试剂盒组份

IV. 注意事项

V. 操作流程

1. 文库稀释
2. qPCR 反应设立
3. qPCR 反应程序
4. 数据分析

VI. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® 是一套基于 qPCR 方法对 Illumina 文库中正确连接 Illumina P5 和 P7 接头的 DNA 片段进行分子数定量的试剂盒。

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® 使用 2×qPCR Mix for Illumina® 和基于 Illumina P5 和 P7 芯片序列设计的文库定量引物，对一系列绝对定量的 DNA 标准品和适当稀释的 Illumina 文库样品进行 qPCR 扩增，以每个 DNA 标准品的浓度（以 pM 为单位）的对数值为横坐标，平均 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线，然后根据标准曲线和文库样品的 Ct 值，对文库中连有 P5 和 P7 接头的 DNA 片段分子数进行定量。

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® 通过严格的质量检测标准，确保试剂盒品质批间差的最小化和产品性能的一致性。所有试剂盒组分均未检出核酸外切酶及内切酶活性，并达到 DNA 污染控制的严格质控要求。

II. 产品应用

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® 适用于对 Illumina 测序文库样品进行准确和重复性高的 DNA 分子数定量。不同构建方法制备的各种类型的文库，无论使用何种 Illumina 测序仪器，只要文库平均片段长度不超过 1 kb，GC 含量在 60% 范围内，浓度大于 0.0002 pM 并含有与文库定量引物互补的序列，都可以使用本试剂盒进行定量（图 1）。

除了 NGS 文库定量，试剂盒也可用于检测文库制备环境里的 DNA 污染。

注：NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® 的文库定量检测流程包括重复的移液步骤。我们推荐有条件的客户使用自动化的液体操作系统，提高分液的稳定性和一致性。

III. 试剂盒组份

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina 包含以下四种组份：

- 1 文库定量 DNA 标准品 (qPCR DNA standard for Illumina)：经过精确定量的六份十倍梯度稀释的 DNA 溶液系列 (20pM-0.0002pM)，用于制作标准曲线；
- 2 文库定量引物 (qPCR Primer Mix for Illumina)：匹配 Illumina P5, P7 芯片序列并经过优化设计的一对 qPCR 引物；
- 3 2×qPCR 预混液 (2×qPCR Mix for Illumina®)：含有性能优化的热启动DNA 聚合酶、qPCR 反应缓冲液和SYBR Green 染料等qPCR 反应所需成分；
- 4 ROX 参比染料 (ROX Reference Dye)。

NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina® (货号：QP100) 试剂盒组份如下表所示。该试剂盒 -20° C 至少保存 12 个月，请注意避免反复冻融。

组份编号	产品组份	体积	描述
QP100-01	2×qPCR Mix for Illumina®	5 mL	qPCR 反应预混液
QP100-02	ROX Reference Dye	200 µL	ROX 参比染料
QP100-03	qPCR primer mix for Illumina (2µM)	1000 µL	文库定量引物
QP101-01	qPCR DNA standard 1 for Illumina (20 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 1
QP101-02	qPCR DNA standard 2 for Illumina (2 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 2
QP101-03	qPCR DNA standard 3 for Illumina (0.2 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 3
QP101-04	qPCR DNA standard 4 for Illumina (0.02 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 4
QP101-05	qPCR DNA standard 5 for Illumina (0.002 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 5
QP101-06	qPCR DNA standard 6 for Illumina (0.0002 pM)	80 µL	文库定量DNA 标准品 6

注：标准品浓度 20 - 0.0002 pM，相当于 5.5 - 0.000055 pg/µL，或 12000000 - 120 dsDNA 分子/µL

另外，我们还单独提供试剂盒中的标准品组份，NGSquant™ DNA Standard for Illumina® (货号：QP101) 试剂盒组份如下表所示。该试剂盒-20° C 至少保存 12 个月，请注意避免反复冻融。

组份编号	产品组份	体积	描述
QP101-01	qPCR DNA standard 1 for Illumina (20 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 1
QP101-02	qPCR DNA standard 2 for Illumina (2 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 2
QP101-03	qPCR DNA standard 3 for Illumina (0.2 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 3
QP101-04	qPCR DNA standard 4 for Illumina (0.02 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 4
QP101-05	qPCR DNA standard 5 for Illumina (0.002 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 5
QP101-06	qPCR DNA standard 6 for Illumina (0.0002 pM)	80 µL	文库定量 DNA 标准品 6

IV. 实验注意事项

1. 产品与样品处理

- 文库样品必须用稀释缓冲液（Dilution Buffer: 10mM Tris-HCl pH8.0, 0.05% Tween 20）进行稀释。稀释缓冲液的成分能降低塑料管和移液吸头对 DNA 的吸附。
- 第一次取样前，先用吸头吸取 5-10 µL 稀释缓冲液，弃去后再吸取 DNA 标准品或文库样品。
- 稀释的文库样品必须在 qPCR 实验前新鲜配制，并放置在冰上或 4°C。文库稀释后不能在室温下储存，也不能在 qPCR 实验前搁置过久（即使是置于 4°C 环境），否则会降低文库定量的精确度和可靠性。

2. 消耗品和仪器

- 实验应使用 DNA 吸附性弱的表面硅化 PCR 管、96 或 384 孔板以及移液吸头。
- 使用正确量程的移液器。比如，取用 2µL 样品时，应选用量程为 0.2 - 2µL 的移液器，而不是 2 - 20 µL 的移液器。移液器必须定期进行校准。
- 尽可能避免使用多通道移液器。

3. 准确的液体操作

- 确保试剂在使用前已经完全解冻并充分混匀，避免产生气泡，短暂离心后备用；
- 对于高浓度的 DNA 样品溶液，避免直接进行大倍数的稀释。如果确实要将样品高倍数稀释到标准品的动态范围内，建议采用分步稀释法（比如将样品等比稀释两次，每次稀释 100 倍，而不是进行单次 10,000 倍的稀释）；
- 每个样品移液步骤结束后应更换新吸头，避免样品（标准品）间交叉污染影响定量的精确度；
- 用吸头吸液时，不要伸入样品液面部过深，避免样品液粘附在吸头外壁；
- 每次吸液结束后，观察吸头液面高度和吸头末端，确认是否已经吸入了足量的液体；

- 移液时要尽量将样品液注入管（孔）的底部；
- 移液结束后要吹打 2-3 次润洗吸头；
- 移液结束后要确认没有液体残留在吸头末端；
- 建议使用自动液体操作设备来稀释文库，设计平行反应。在处理的样品数目较大时，自动液体操作设备能提供最高的稳定性和一致性。

V. 操作流程

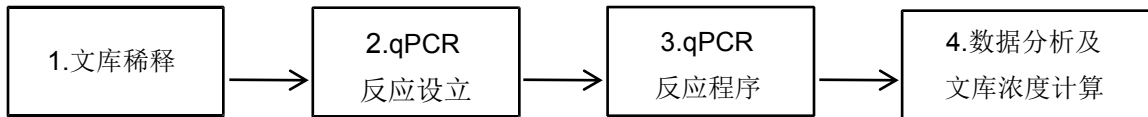


图 1. NGSquant™ Library qPCR kit 文库定量操作流程。

1. 文库稀释

1. 文库初始浓度估算

未稀释文库的初始浓度应该根据以前的定量结果或用其他方法（Nanodrop, Qubit 或 Bioanalyzer 的浓度测定结果进行估算。但应注意由于分光光度法、电泳法的定量原理和 qPCR 法定量原理不同，有些情况下两者的结果差异较大（尤其对于浓度极高或者极低的文库，或者过度扩增的文库）。我们推荐您使用 GeneCopoeia 的 NGSquant™ 荧光定量检测试剂盒对样品进行初步定量。

2. 稀释方案

根据估算的结果，将文库稀释到标准品的浓度范围之内（20 - 0.0002 pM，相当于 12000000-120 dsDNA 分子/μL）。不同类型的文库需要按不同比例稀释，以下是建议的起始稀释比例：

文库类型	稀释说明
为直接测序准备的 扩增文库	例子：为 WGS, ChIP-Seq, RNA -Seq 或扩增子测序制备的文库。 优化过的扩增文库浓度应该在 2-20nM 之间。 高浓度的文库必须稀释后进入试剂盒的动态范围内。 第一次稀释推荐尝试 1/10,000 的比例（稀释后文库浓度在标准曲线上的位置应该介于 DNA 标准品 2 和 3 之间）。
靶标捕获文库 (捕获后 扩增后)	捕获后扩增的文库浓度取决于特定的捕获方法。 如果您之前没有文库浓度进行估算（根据经验或别的方法测得的浓度），第一次稀释请尝试 1/100,000 的比例。 使用本次定量的结果来调整下次同类实验的稀释比例。

靶标捕获文库 (捕获前 扩增后)	单次捕获时每次杂交通常需要 ~1μg 文库；多重捕获时，对每个文库的样品量要求更低些（总量除以捕获文库的总数目）。 捕获前扩增的文库浓度通常在 10-150ug/μL（50-800uM）范围内，取决于文库体积和平均片段长度。 如果您之前没有文库浓度进行估算（根据经验或别的方法测得的浓度），第一次稀释请尝试 1/100,000 的比例（稀释后文库浓度在标准曲线上的位置应该介于 DNA 标准品 1 和 3 之间）。
---------------------	---

稀释后的文库在加样前应置于冰上或 4 °C。

2. qPCR 反应设立

反应前须先计算好实验中需用多少份体系，考虑到分装后的损失，应多计算 5%-10% 的分量。将所需分量的 2×qPCR Mix for Illumina®, ROX Reference Dye, qPCR primer mix for Illumina (2μM) 与 ddH₂O 先混合，充分混匀，短暂离心后分装到每个孔中。最后再加入待测样品与 DNA 标准品。

1. 20μL 反应体系：推荐在 96 孔板或 384 孔板上使用：

试剂	体积	终浓度
2×qPCR Mix for Illumina®	10μL	1×
ROX Reference Dye	0.1~0.4μL	600nM~150nM
qPCR primer mix for Illumina(2μM)	2μL	0.2 μM
qPCR standard DNA for Illumina/文库样品	5μL	
ddH ₂ O	补足 20μL	

注：在 384 孔板上使用 20μL 反应体系时，注意上机前避免剧烈晃动 384 孔板，以免液体沾到热封膜上而引起荧光读数异常。

5.2.2 10μL 反应体系：在 384 孔板上使用，但不建议在 96 孔板上使用：

试剂	体积	终浓度
2×qPCR Mix for Illumina®	5μL	1×
ROX Reference Dye	0.05~0.2μL	600nM~150nM
qPCR primer mix for Illumina(2μM)	1μL	0.2 μM
qPCR standard DNA for Illumina/文库样品	2μL	
ddH ₂ O	补足 10μL	

5.2.3 ROX 参比染料的体积取决于所使用的 qPCR 仪器，参见下表：

仪器	ROX 的添加体积 (20 μ L 反应体系)	ROX 的添加体积 (10 μ L 反应体系)	终浓度
BioRad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	0	0	0
ABI PRISM,7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast,ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 μ L (0.2-0.4 μ L)	0.2 μ L (0.1-0.2 μ L)	600 nM (300-600nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI Viiia7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.1 μ L (0.02-0.1 μ L)	0.05 μ L (0.01-0.05 μ L)	150 nM (30-150nM)

5.2.4 平行实验与参照

为了提高文库定量结果的精确度和可信度，建议在实验设立时引入参照，并对标准品和文库样品设计如下平行实验：

- DNA 标准品系列：每个标准品设三个平行孔；
- 待测定量文库：稀释到文库定量动态范围后，再往下稀释 4 个梯度，每个梯度设三个平行孔。
- 无模板参照：用等体积 ddH₂O 代替 DNA 模板，每次反应设 2-3 个无模板参照。

5.3 qPCR 反应程序

步骤	温度	时间	荧光读数	循环数
预变性 ^a	95° C	30 sec	否	1
变性	95° C	10 sec	否	40
退火	58° C	10 sec	否	
延伸	72° C	35 sec ^b	是	
溶解曲线分析 ^c				1

a: 请严格执行这一步骤的时间，本步骤的目的是使 DNA 模板预变性并使 DNA 聚合酶复性。

b: 如果文库平均长度超过 600bp，应将退火延伸时间延长至 45s 或者 60s。

c: 不同仪器溶解曲线设置的程序不尽相同，一般使用仪器默认程序即可。也可以根据实验的需要选择 是否进行溶解曲线分析。

4. 数据分析

1. 标准曲线分析

qPCR 反应结束后，如果样品制备足够精确，标准品复孔间 Ct 值的差异均不应超过 0.3。如果两个复孔 Ct 值相近，与第三个复孔差异较大，则可以舍弃第三个复孔的 Ct 值。根据以上原则，计算六个 DNA 标准品的 Ct 值平均值为纵坐标，以对应的标准品浓度（pM）的对数值为横坐标，绘制标准曲线。标准曲线的线性相关系数 R² 应大于 0.99，斜率在 -3.1 和 -3.6 之间（对应扩增效率 110%- 90%）。如果标准曲线未达到以上要求，需要重复试验。

Ct 值

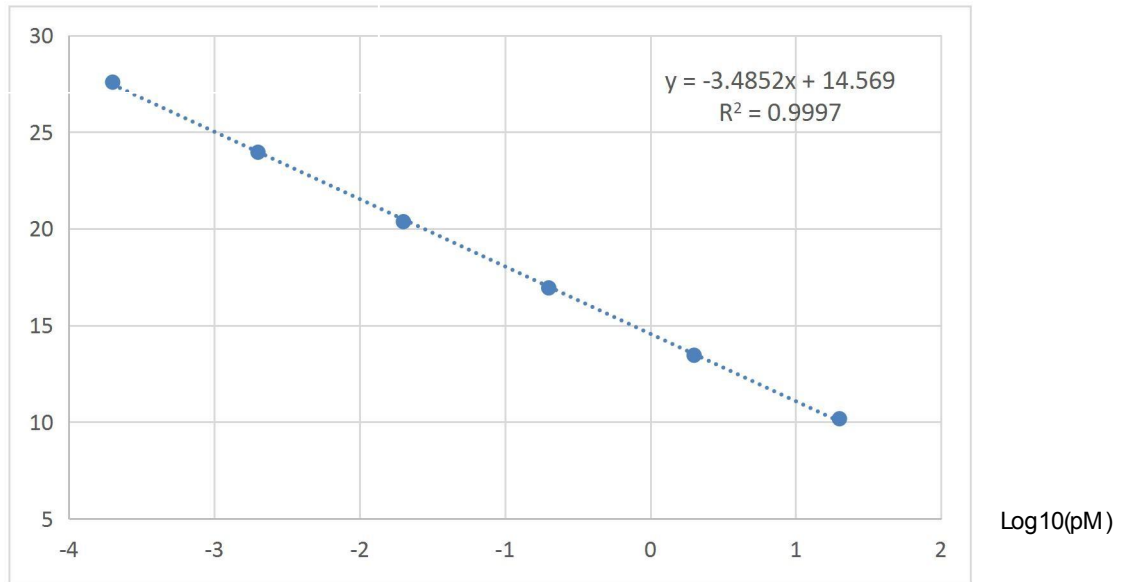


图 2. NGS qPCR DNA standard for Illumina 标准曲线

2. 扩增效率分析

反应结束后仪器会根据 DNA 标准品的 Ct 读值自动生成扩增效率的读数。您也可以根据标准曲线的斜率，通过以下公式计算 DNA 标准品的扩增效率。DNA 标准品及文库样品扩增效率在 90~110% 范围内，所得结果可用于数据分析。

$$\text{扩增效率} = [10^{(-1/\text{标准曲线斜率})} - 1] \times 100\%$$

扩增效率为 100% 时，相邻的两个 DNA 标准品 Ct 值 (Δ Ct) 应该相差约 3.32 个循环数。

如果扩增效率小于 90%，或相邻的两个 DNA 标准品之间的 Δ Ct 系统性地扩大，体系中就有可能存在 DNA 聚合反应的抑制剂；

反之，如果扩增效率大于 110%，或相邻的两个 DNA 标准品之间的 Δ Ct 系统性地缩小，那么应该考虑 DNA 标准品是否有外源 DNA 污染，或者稀释的 DNA 标准品被浓度更高的 DNA 标准品“污染”。要避免后一种情况，可以从低浓度 DNA 标准品开始依次加样，从 DNA 标准品 6 加到标准品 1，或者在每次 DNA 标准品加样时更换吸头，并仔细留意操作过程中是否引入了污染。

3. 熔解曲线分析

基于 SYBR Green I 的 qPCR 实验经常在结束后进行熔解曲线的分析，以验证反应产物的特异性。但在文库 DNA 定量中，熔解曲线分析没那么重要。因为在文库定量中，被扩增的模板不是长度和 GC 含量均一的 DNA 片段，而是长度各异、GC 含量各异的 DNA 片段混合物。不同于单一扩增子的熔解曲线，Illumina® 文库的熔解曲线是综合性的，代表文库中所有片段的平均值。需要注意的是，样品文库的 Ct 值一般比较靠前，而熔解曲线分析在 40 个循环后进行，此时 PCR 底物已经基本耗尽，扩增子的数量不再代表模板的原始模板的量，这使得文库定量实验中的熔解曲线分析更加难以解读。

尽管如此，熔解曲线分析仍可应用于鉴定 Illumina® 文库中的接头二聚体残留。接头二聚体是文库构建阶段由全长接头生成的，在文库定量实验中它们会被高效扩增，产生假阳性信号。如果二聚体残留量达到一定数量，会导致高估文库浓度。注意，文库定量的熔解曲线分析仅能用于判断是否存在接头二聚体残留，不能用于定量计算二聚体残留对文库浓度计算产生了多大的干扰。

4. 文库 DNA 浓度校正

在使用标准曲线将每个稀释文库的平均 Ct 值转换成浓度（pM 单位）后，必须进行一项“长度校正计算”用于补偿 DNA 标准品扩增产物的长度（452bp）和文库 DNA 平均片段长度之间产生的荧光信号差异。公式如下：

$$\text{文库实际浓度} = \text{文库计算浓度} \times \text{DNA 标准品扩增产物长度 (452bp)} / \text{文库平均片段长度}$$

在基于 SYBR Green I 染料的 qPCR 定量方法中，长度校正计算是必不可少的。长 DNA 片段比短 DNA 片段能按长度比例结合更多的 SYBR Green I 荧光分子，因此荧光强度与双链 DNA 长度成正比例，一个由长片段构成的文库必然比相同拷贝数度的短片段构成的文库产生更强的荧光（更低的 Ct 值）。如果 Illumina® 文库的 DNA 平均片段底物长度与标准品 DNA（460bp）有明显的差异，必须进行长度校正以确保浓度计算结果的准确性与可靠性。

5. 文库浓度与簇密度之间的关联

即使由 qPCR 绝对定量产生的数据是可靠的，我们还是不能确定稀释的文库以最优的簇数量结合到测序仪芯片上。文库浓度的计算值和生成的簇密度之间可能产生差异的原因如下：

- 文库定量和测序仪上样过程中包含大量的液体处理操作，这些操作是易于出错的；
- 簇扩增是一个包含很多变量的复杂过程，许多变量是与仪器相关的；
- 基于 qPCR 的定量方法使用的 2×qPCR Mix for Illumina® 能确保温度中不同长度和 GC 含量的所有 DNA 片段都能得到同等高效的扩增，但是测序仪中簇扩增（桥接 PCR）使用的是另一种聚合酶，对不同片段的扩增效率不能保持一致；

总而言之，NGSquant™ Library qPCR Kit for Illumina 测出的文库浓度和簇密度之间的关联最终还是取决于用户对文库、仪器和工作流的总体经验判断。因此，实验操作时一定要格外小心谨慎，一丝不苟，对实验结果进行科学合理的分析与解读。对于一个新手来说，采纳以下建议会有所帮助：

- 选择若干文库样品（最好是测序过的）进行系列稀释，于不同的日期用本试剂盒做定量测试，确认每次能产生可重复的 qPCR 数据。一般来说，每次测试文库浓度时应该使用新鲜稀释的 DNA 标准品和文库样品。一般认为一个样品的系列稀释浓度计算值之间或者同一样品不同日期浓度计算值之间不超过10% 的误差是可以接受的。
- 在最经常使用的仪器上重复同一组待测文库样品进行成簇扩增，以此来检验成簇扩增过程的可信度。
- 建立和维护一个文库样品浓度和簇密度数据库（包括不同的仪器和不同的定量方法产生的数据），有助于判断在常用实验环境和条件下文库浓度和簇密度之间的关联，也有助于进行过程优化、质量控制和问题排除。

VI. 使用许可与质量保证

使用许可

以下条款适用于 NGSquant™ Library qPCR kit for Illumina®产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打 4006-020-200 联系我们。

© 2022, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)

Note: Illumina® is a registered trademark of illumina.