

## NGS cfDNA Library Quantification Kit for Illumina NGS cfDNA文库定量试剂盒 (Illumina)

项目号:N665917

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	N665917-1ml	N665917-5ml
2×SYBR qPCR MasterMix	1ml	5×1ml
qPCR Primer Mix	100μl	500μl
DNA Standard A	100μl	500μl
DNA Standard B	100μl	500μl
DNA Standard C	100μl	500μl
DNA Standard D	100μl	500μl
DNA Standard E	100μl	500μl
50×High ROX	40μl	200μl

### 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 10min。该产品特异性强、扩增效率高, 试剂盒中的标准品长度 (约 270bp) 与 cfDNA NGS 文库的平均长度 (250-300bp) 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 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, ViiA7 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 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 1kb, 浓度不低于 0.02pM 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

#### 扩增模板准备

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

#### 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 MasterMix	10 $\mu$ l
qPCR Primer Mix	0.8 $\mu$ l
Template	4 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5.2 $\mu$ l

说明：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。

qPCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10sec	40
退火/延伸	62 $^{\circ}$ C	30sec	

如文库平均长度大于 700bp，应适量增加退火/延伸时间。

溶解曲线参照具体仪器设定程序。

## 数据分析

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<sup>2</sup> 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	60pM
DNA Standard B	6pM
DNA Standard C	0.6pM
DNA Standard D	0.06pM
DNA Standard E	0.006pM

## 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

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。

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。

避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。

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。