

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

项目号:N665925

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	N665925-1ml	N665925-5ml
2×SYBR qPCR Master Mix 1	1ml	5ml
qPCR Primer Mix 1	100μl	500μl
DNA Standard I	100μl	500μl
DNA Standard II	100μl	500μl
DNA Standard III	100μl	500μl
DNA Standard IV	100μl	500μl
DNA Standard V	100μl	500μl
50×High ROX	40μl	200μl

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 10min。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 (10mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释, 稀释后浓度尽量在 0.05-50pM 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 μ l 的基础反应体系如下:

试剂	20 μ l 反应体系
2 \times SYBR qPCR Master Mix	10 μ l
qPCR Primer Mix 1	0.8 μ l
Template	4 μ l
ddH ₂ O	5.2 μ l

说明: High Rox 机型: 每 50 μ l 反应体系加入 1 μ l High Rox;

Low Rox 机型: 每 500 μ l 反应体系加入 1 μ 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 μ 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 μ l/孔。推荐使用 20 μ 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 $^{\circ}$ C	10min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10sec	40
退火/延伸	60 $^{\circ}$ C	30sec	
溶解曲线分析	65-95 $^{\circ}$ C		

1) 退火温度请以60-64 $^{\circ}$ 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700bp, 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 I	50pM
DNA Standard II	5pM
DNA Standard III	0.5pM
DNA Standard IV	0.05pM
DNA Standard V	0.005pM

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。