

ExCell Bio

**TrueLib 二代测序文库定量试剂盒 (适配
Illumina) ,标准品 1~6**

**TrueLib Library Quantification Kit
for Illumina, Standards 1~6**

User Manual

Catalog Number NGS00-1045S 25 μ L \times 6



产品概述

TrueLib二代测序文库定量试剂盒是针对Illumina高通量测序平台而设计的文库定量试剂盒，采用qPCR的方法对文库进行绝对定量。采用P5/P7引物，通过绘制标准曲线，再根据标准曲线计算待测文库绝对浓度。精确定量可用于池化的完整测序文库，同时通过分析标准品熔解曲线的二聚体指示峰，可检测实验环境中文库污染程度，评价文库的质量。标准品1~6可用于针对Illumina高通量测序平台而设计的文库定量试剂盒标准曲线的绘制。标准品试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证文库定量的稳定性和重复性。

产品应用

本品是针对Illumina®平台高通量测序文库浓度绝对定量而设计的标准品组分.可与本公司的TrueLib二代测序文库定量试剂盒配套使用，也可以适配其他公司（如KAPA）针对Illumina®平台的文库定量试剂盒。

特别提醒

1. 避免试剂的反复冻融。
2. PCR产物因操作不当极易产生污染，导致文库定量实验结果不准确，建议将文库定量反应体系配制区与PCR产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定时对各实验区域进行清洁。
3. 使用带滤芯枪头，并每次移液都要更换枪头。

产品组分及储存条件

| 组分 | 体积 |
|------------|------------|
| Standard 1 | 25 μ L |
| Standard 2 | 25 μ L |
| Standard 3 | 25 μ L |
| Standard 4 | 25 μ L |
| Standard 5 | 25 μ L |
| Standard 6 | 25 μ L |

组分说明：该标准品包装足够进行6次标准曲线绘制(3孔重复)。

干冰运输，-20℃避光保存，有效期一年。

1 实验流程

(以下以本公司的 TrueLib 二代测序文库定量试剂盒 NGS00-1041 为例)

1. 文库稀释

根据文库的预估浓度, 以 1/1,000-1/100,000 比例稀释为参考, 用适量平衡至室温的 DNA 稀释液 [10mM Tris-HCl, pH 8.0 (25°C) + 0.05% Tween 20 (optional)] 稀释, 文库稀释液应现用现配, 用完妥善处理, 避免污染。

2. 设置反应体系与程序

2.1 20 μ L 反应体系

| For Universal qPCR Master Mix | ROX | No ROX |
|---|------------------|------------------|
| 2xSYBR qPCR Master Mix | 10 μ L | 10 μ L |
| 10xPrimer Premix | 2 μ L | 2 μ L |
| ROX Reference dye I(50x) /ROX Reference dye II(50x) (可选) | 0.4 μ L | 0 μ L |
| 稀释后的文库或 DNA Standard1-6 或 ddH ₂ O | 4 μ L | 4 μ L |
| ddH ₂ O | Up to 20 μ L | Up to 20 μ L |

* 在标准曲线反应管中加入 DNA Standards; 在样品反应管中加入稀释后的文库; 在 NTC 阴性对照反应管中加入灭菌蒸馏水, 每个样品三个重复。

* 根据具体机型, 选择是否使用 ROX。

2.2 设置 qPCR 程序

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |
|------|---------|--------|----|
| 预变性 | 95°C | 5 min | 1 |
| 变性 | 95°C | 20 sec | 35 |
| 退火 | 56°C | 30 sec | |
| 延伸 | 72°C | 50 sec | |
| 溶解曲线 | 65-95°C | | |

* 当文库片段长度大于 600bp 时, 增加延伸时间到 90 sec。

3. 数据分析

3.1 参照 NTC 的 CT 确认标准曲线 CT 有效范围

如果 $CT(NTC) > CT(DNA\ Standard\ 6) + 3$ ，则最大有效CT为CT (DNA Standard 6)，应使用DNA Standard 1-6所产生的CT绘制标准曲线；

如 $CT(DNA\ Standard\ 6) + 3 > CT(NTC) > CT(DNA\ Standard\ 5) + 3$ ，则最大有效CT为CT (DNA Standard 5)，应使用DNA Standard 1-5所产生的CT绘制标准曲线；

如 $CT(DNA\ Standard\ 5) + 3 > CT(NTC) > CT(DNA\ Standard\ 4) + 3$ ，则最大有效CT为CT (DNA Standard 4)，应使用DNA Standard 1-4所产生的CT绘制标准曲线；

基于定量准确性考虑，请至少使用4个CT (DNA Standards)绘制标准曲线。如 $CT(DNA\ Standard\ 4) + 3 > CT(NTC)$ ，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试验。

3.2 标准曲线的绘制

DNA 标准品信息如下所示：

| | |
|----------------|-----------|
| DNA Standard 1 | 20 pM |
| DNA Standard 2 | 2 pM |
| DNA Standard 3 | 0.2 pM |
| DNA Standard 4 | 0.02 pM |
| DNA Standard 5 | 0.002 pM |
| DNA Standard 6 | 0.0002 pM |

* 表中所示 DNA Standard 浓度非反应终浓度，实验时不需换算终浓度，只需保证 DNA Standard、稀释文库在反应中加入的体积相同。如果操作精准，实验复孔之间的 $Ct \leq 0.2$ ，查看扩增曲线以及 Ct 值是否正常，并去除明显异常的数值。如果数据存在较大偏差，则实验结果不可信。请检查移液器是否精准，重新实验。

标准曲线需符合下列准则：

- * 连续两组 DNA 标准品之间的平均 ΔCt 值在 3.1-3.6。
- * 标准曲线显示的扩增效率应在 90%-110%。
- * $R^2 \geq 0.99$ 。

如果标准曲线不符合这些准则，不能准确估算文库浓度，需重新绘制标准曲线。

3.3 文库浓度计算

* 如果稀释的文库所得 Ct 平均值小于 DNA Standard 1 或大于 Standard 6 的 Ct 值。即稀释后的文库 Ct 值在标准曲线以外，请选择合适的稀释比，重新稀释文库。

* 根据复孔间 Ct≤0.2 的原则，对稀释文库原始 Ct 进行筛选，并计算平均 Ct。然后，根据标准曲线计算稀释文库的浓度(pM)。

* 结合标准品(452bp)，根据下述公式对稀释文库的浓度(pM)进行长度矫正：

调整后的稀释文库浓度(pM)=[452bp/文库平均长度(bp)]×稀释文库的浓度(pM)

* 根据下述公式计算文库的原始浓度(nM)。

原始文库浓度(nM)=调整后的稀释文库浓度(pM)×稀释倍数/1,000

实例分析

1. 文库构建

TrueLib DNA Library Rapid Prep Kit for Illumina 构建的 2 个人类基因组 DNA 文库(150 ng)，磁珠筛选连接接头后的文库片段。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 来确定每个扩增文库大概的平均长度及浓度。具体数据如表 2 所示。

对每个文库进行 1/10,000 和 1/20,000 的稀释。所有文库样品、DNA 标准品以及阴性对照设置三个重复。

2. 绘制标准曲线

排除 DNA Standard 1 和 Standard 6 中的异常 Ct 值后，所得标准曲线如图 1 所示：

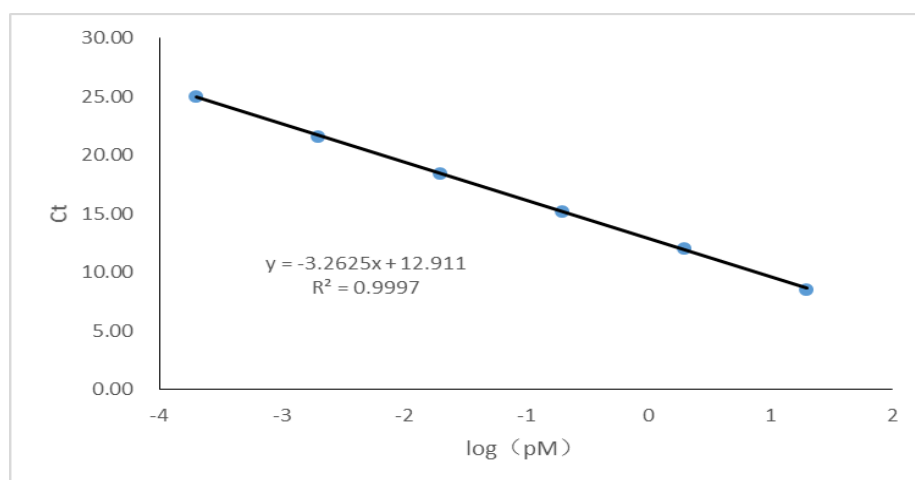


图 1. TrueLib Library Quantification Kit 标准曲线

6 个标准品和 1 个阴性对照的具体 Ct 值如表 1 所示：

根据复孔间 Ct \leq 0.2 的原则，过滤 DNA Standards 原始 Ct，并计算平均 Ct。

表 1 DNA 标准品 Ct 值

| DNA Standard | Conc(pM) | Ct Score | Average Ct | Δ Ct |
|--------------|----------|------------------|------------|-------------|
| 1 | 20 | 8.45 | 8.54 | N/A |
| | | 8.62 | | |
| | | 8.28 | | |
| 2 | 2 | 12.06 | 12.10 | 3.56 |
| | | 12.15 | | |
| | | 12.08 | | |
| 3 | 0.2 | 15.25 | 15.20 | 3.10 |
| | | 15.17 | | |
| | | 15.18 | | |
| 4 | 0.02 | 18.5 | 18.48 | 3.28 |
| | | 18.41 | | |
| | | 18.54 | | |
| 5 | 0.002 | 21.65 | 21.62 | 3.14 |
| | | 21.69 | | |
| | | 21.53 | | |
| 6 | 0.0002 | 25.23 | 25.00 | 3.38 |
| | | 24.95 | | |
| | | 25.05 | | |
| NTC | N/A | No Ct | No Ct | N/A |
| | | No Ct | | |
| | | No Ct | | |

3. 文库浓度计算

表 2 中：

第 4 组数据显示了三个文库的 Ct 值。计算每个文库三个重复的 Ct 值时，舍弃文库 1 的 1/20,000 稀释中的异常值(>0.2 Ct)。

第 7 组数据显示了通过标准曲线计算稀释文库的浓度(pM)。

第 8 组数据显示，根据文库平均长度，计算调整后的文库稀释浓度。

第 9 组和第 11 组数据显示，根据稀释倍数计算初始文库浓度(nM)和平均初始浓度。

表 2 基于 qPCR 定量试剂盒准备的 Illumina 测序文库

| | 参数 | 文库 1 | | 文库 2 | | 对照 | |
|----|---------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------|--------|-------|
| 1 | 片段平均长度(Bioanalyzer) | 569bp | | 578bp | | 452bp | |
| 2 | 估算浓度(Bioanalyzer) | 14.35ng/μL | | 48.50ng/μL | | 680 pm | |
| 3 | 稀释 | 1/10K | 1/20K | 1/10K | 1/20K | 1/10K | 1/20K |
| 4 | Ct | 10.76 | 11.74 | 8.89 | 9.99 | 16.64 | 17.61 |
| | | 10.79 | 11.80 | 8.94 | 9.99 | 16.70 | 17.63 |
| | | 10.95 | 11.98 | 9.03 | 10.02 | 16.82 | 17.77 |
| 5 | Ct 平均值 | 10.83 | 11.77 | 8.95 | 10.00 | 16.72 | 17.67 |
| 6 | ΔCt | 0.94 | | 1.05 | | 0.95 | |
| 7 | 稀释文库计算浓度(pM) | 4.34 | 2.24 | 16.37 | 7.8 | 0.068 | 0.035 |
| 8 | 片段长度调整后浓度(pM) * | 3.45 | 1.78 | 12.80 | 6.10 | 0.068 | 0.035 |
| 9 | 初始文库浓度(nM) | 34.50 | 35.55 | 128.03 | 122.04 | 0.680 | 0.696 |
| 10 | 不同稀释度文库定量差异 | 3.0% | | 4.9% | | 2.3% | |
| 11 | 平均初始浓度 | 35.03nm=13.16ng/μL | | 125.03nm=47.7ng/μL | | 688pm | |

* SYBR Green 1 的荧光信号强度是由 DNA 的量决定的，即低浓度的样品经过多次扩增可以与经少次扩增的高浓度样品达到相同的荧光强度。因此，根据文库平均长度来调整文库浓度是一个简单的乘法运算，即所测得浓度乘以 DNA Standard(452 bp)与文库片段平均长度的比值。

摩尔浓度换算成质量浓度公式：

$$\text{pmol DNA} \times \frac{660\text{pg}}{\text{pmol}} \times \frac{1\mu\text{g}}{10^6\text{pg}} \times N = \mu\text{g DNA}$$

(N: 核苷酸数, $\frac{660\text{pg}}{\text{pmol}}$: 一个核苷酸对的平均分子量)

4. 文库溶解曲线分析

溶解曲线主要是用于显示 Illumina libraries 中的接头二聚体。如图 2 所示 DNA Standard 的溶解曲线呈现典型的双峰。这是 452 bp 线性模板溶解曲线所特有的，不能说明其存在非特异扩增。

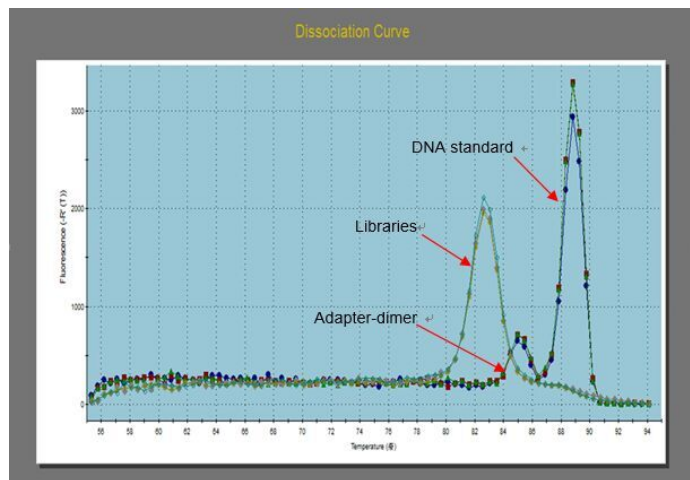


图 2 DNA Standard 溶解曲线

? 常见问题及解答

| | |
|-------------------------|--|
| DNA Standard 1 Ct 延后 | <ul style="list-style-type: none"> ▲ 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 ROX Reference Dye 与定量仪器匹配。 |
| 扩增效率偏出 90%-110%范围 | <ul style="list-style-type: none"> ▲ 如 Ct (NTC) - Ct (DNA Standard 6) < 3 或者 Ct (DNA Standard 6) - Ct (DNA Standard 5) < 3.1, 且计算扩增效率超过 100%, 提示反应体系有污染。应根据 NTC 阴性对照的融解曲线确认污染源(文库污染或 DNA Standards 污染)。绘制标准曲线时, 应先根据 Ct (NTC)确定标准曲线有效 Ct 值范围, 舍弃受污染影响的 Ct, 使用剩余的 Ct 绘制。 ▲ 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。 |
| R ² < 0.99 | <ul style="list-style-type: none"> ▲ 受污染影响的标准品的 Ct 值未舍弃。 ▲ 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。 ▲ 仪器相关问题。确认所用 ROX Reference Dye 与定量仪器匹配。 ▲ 移液精确度差。 |
| 标曲扩增曲线分布不均一 | <ul style="list-style-type: none"> ▲ Ct (DNA Standard 6) - Ct (DNA Standard 5) < 3.1, 提示反应体系有污染。应根据 NTC 阴性对照的融解曲线确认污染源(文库污染或 DNA Standards 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。 ▲ DNA Standards 之间的 ΔCt > 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; 确认每个三个复孔的数据 Ct≤0.2, 否则去掉。 |

| | |
|--------------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ▲长时间强光照射会导致 2xSYBR qPCR Master Mix 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。 |
| 复孔重复性差 | <ul style="list-style-type: none"> ▲移液精确度差。 ▲所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。 ▲仪器相关问题。确认所用 ROX Reference Dye 与定量仪器匹配。 |
| 文库各稀释度 ΔCt 与稀释倍数差异不一致 | <ul style="list-style-type: none"> ▲移液精确度差。 ▲所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。 ▲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。 |
| 文库各稀释度计算的初始文库浓度差异超过 10% | <ul style="list-style-type: none"> ▲移液精确度差。 ▲所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。 ▲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 超过标准曲线有效 Ct 范围 | <ul style="list-style-type: none"> ▲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。常规文库在 1/10,000 左右的稀释度时得到的 Ct 不应超过 Ct (DNA Standard 6)。减少稀释倍数重复实验。 |
| DNA Standards 有扩增，而文库没有或 Ct 很大 | <ul style="list-style-type: none"> ▲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。 |


备注

在确认本产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。