

## M5 NGS cfDNA Library Quantification Kit for Illumina 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 NGS cfDNA Library Quantification Kit for Illumina	1ml	MF322-01
M5 NGS cfDNA Library Quantification Kit for Illumina	5ml	MF322-05

### 【储存条件】

-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 10 min。该产品特异性强、扩增效率高，试剂盒中的标准品长度（约 270 bp）与 cfDNA NGS 文库的平均长度（250-300 bp）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, 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 StepOne/Step One Plus 等。

注：High Rox 和 Low Rox 的配制方法见使用方法 2 中说明。

### 【产品组分】

	MF322-01	MF322-05
2×SYBR qPCR MasterMix	1 ml	5×1 ml
qPCR Primer Mix	100 μl	500 μl
DNA Standard A	100 μl	500 μl
DNA Standard B	100 μl	500 μl
DNA Standard C	100 μl	500 μl
DNA Standard D	100 μl	500 μl
DNA Standard E	100 μl	500 μl
50×High ROX	40 μl	200 μl

### 【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 1 kb，浓度不低于 0.02 pM 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。

### 【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。

### 【操作步骤】

#### 1. 扩增模板准备

将待检测文库样品用 TE (10 mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释, 稀释后浓度尽量在 0.01-60 pM 之间。4°C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  $\mu$ 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。

#### 3. qPCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火/延伸	62°C	30 sec	

- 1) 如文库平均长度大于 700 bp, 应适量增加退火/延伸时间。
- 2) 溶解曲线参照具体仪器设定程序。

### 【数据分析】

#### 1. 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	60 pM
DNA Standard B	6 pM
DNA Standard C	0.6 pM
DNA Standard D	0.06 pM
DNA Standard E	0.006 pM

#### 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。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认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。