



Ideas & Chemistry

18-03



GenNext™ NGS Library Quantification Kit

(Code No. NLQ-101)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

— 目 录 —

[1] 序言	1
[2] 产品内容	2
[3] 产品以外需要准备的物品	4
[4] 文库的稀释	4
[5] 使用方法	6
[6] 数据分析	7
[7] 常见问题	8
[8] 相关产品	9

注意

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂使用。在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室的一般注意事项，安全规范。

※illumina® 是 illumina Inc.注册的商标。

※SYBR®、Qubit®、Applied Biosystem®、NanoDrop™、StepOne™、StepOnePlus™是 Thermo Fisher Scientific K.K.注册的商标或者商标。

[1] 序言

GenNext™ NGS Library Quantification Kit 是 illumina® 二代测序用的文库定量试剂盒。可定量范围仅限含有 P5、P7 接头进而在 flow cell 上可以正常扩增的文库序列，定量结果特异且准确。

本试剂盒使用了能够扩增长链及高 GC 含量目的片段的 KOD SYBR® qPCR Mix 试剂。

◆特征◆

1. 降低了序列偏差性

采用了 KOD SYBR® qPCR Mix，不易受文库的 GC 含量及长度的影响。使用本产品定量，可以得到稳定的 cluster 密度。

2. 更广的可定量区域

备有从 20 pM 到 0.0002 pM 的 6 个浓度的 Standard DNA，可以在较广的范围内进行准确的定量。

3. 简便

本产品含有文库定量必需的全部试剂（qPCR 试剂、Primer Mix、Standard DNA、以及文库稀释 buffer），可以很方便地进行文库的定量。

关于 KOD SYBR® qPCR Mix

KOD SYBR® qPCR Mix 是去除了 3'→5' Exonuclease 活性（校正活性）的 KOD exo(-) DNA polymerase 与优化过的 buffer 组合而成的高性能 SYBR® Green I 分析用 MasterMix 试剂。通过将 KOD 卓越的合成能力最大限度地发挥出来，对 GC 含量超过 80% 的目的片段及长链目的片段（~2kb）也能够稳定地进行 Realtime PCR 检测分析。

[2] 产品内容

本产品由以下试剂组成，20 μ l 反应体系可使用 500 次。

· KOD SYBR[®] qPCR Mix*

产品组成	包装	保存温度
KOD SYBR [®] qPCR Mix	5ml (1.67ml \times 3)	-20 $^{\circ}$ C (或者 2~8 $^{\circ}$ C 3 个月以内) 避光保存
50 \times ROX reference dye	250 μ l	-20 $^{\circ}$ C (或者 2~8 $^{\circ}$ C) 避光保存

*提供 KOD SYBR[®] qPCR Mix(code No. QKD-201)。

· Standard & Primer Set

产品组成	包装	保存温度
Standard DNA 1 (20 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Standard DNA 2 (2 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Standard DNA 3 (0.2 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Standard DNA 4 (0.02 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Standard DNA 5 (0.002 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Standard DNA 6 (0.0002 pM)	200 μ l	-20 $^{\circ}$ C
5 \times Primer Mix	2 ml (1 ml \times 2)	-20 $^{\circ}$ C
50 \times Dilution Buffer	1.7 ml	-20 $^{\circ}$ C

KOD SYBR[®] qPCR Mix

- 含有反应 buffer、SYBR[®] Green I、dNTPs、Mg²⁺、KOD exo(-) DNA polymerase 以及热启动抗体等 2 \times 浓度的预混液。
- 不含有 ROX (passive reference dye)。
- 产品送到后，请于-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。
- 初次使用前务必充分混匀。之后，可在 2~8 $^{\circ}$ C 低温保存三个月。
- 长期不使用应在-20 $^{\circ}$ C 下保存。经过验证，本产品反复冻融 10 次对品质没有影响。
- 为防止 SYBR[®] Green I 的荧光品质下降，请注意避光保存。

50×ROX reference dye

· 使用 Applied Biosystems®、Agilent Technologies 等相关型号的仪器时，为了校正孔间荧光强度及分装误差，反应体系中请添加 passive reference。最适添加量因仪器种类不同而异。主要仪器的添加量，请参阅 **p.7 [5] 使用方法 (1) 反应液的制备**。

- 不需要 passive reference 校正的仪器则无需添加。
- 请在-20°C 或者 2~8°C 避光保存。
- 长期不使用时，请在-20°C 冷冻保存。

※稳定使用同一浓度的 ROX reference dye 时，可事先将 50×ROX reference dye 与 KOD SYBR® qPCR Mix 混合后保存。混合后缓慢颠倒混匀，请根据上述 KOD SYBR® qPCR Mix 保存条件进行保存。混合比率如下所示。关于 ROX 的浓度，请参阅 **p.7 [5] 使用方法 (1) 反应液的制备**。

按 1×ROX 浓度使用时

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 66.8μl

按 0.1×ROX 浓度使用时

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 6.7μl

Standard DNA

提供了作为 Standard DNA 的 6 个梯度的 10 倍稀释系列（20~0.0002pM）。Standard DNA 含有 illumina®二代测序文库中使用的 P5、P7 序列，扩增长度为 452 bp。

5×Primer Mix

引物可用于扩增包含 P5、P7 接头序列的文库 DNA。

Primer Forward : 5'- ATA CGG CGA CCA CCG AGA TC -3'

Primer Reverse : 5'- CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA G -3'

※如果预先将 5×Primer Mix、50×ROX reference dye 以及灭菌水与 KOD SYBR® qPCR Mix 混合，请根据上述 KOD SYBR® qPCR Mix 的保存条件进行保存。混合比率如下。关于 ROX 的浓度，请参照 **p.7 [5] 使用方法 (1) 反应液的制备**。

使用 1×倍浓度的 ROX 时

qPCR Mix : 50×ROX : 5×Primer Mix : 灭菌水 = 800μl : 32μl : 320μl : 128μl

使用 0.1×倍浓度的 ROX 时

qPCR Mix : 50×ROX : 5×Primer Mix : 灭菌水 = 800μl : 3.2μl : 320μl : 156.8μl

不使用 ROX 时

qPCR Mix : 5×Primer Mix : 灭菌水 = 800μl : 320μl : 160μl

50× Dilution Buffer

50× Dilution Buffer 用灭菌水稀释 50 倍后的可用于文库稀释，稀释后请于 4°C 保存。

1× Dilution Buffer 的组成如下：10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA、0.1% Tween 20

Dilution Buffer 只能用于文库定量的稀释之用。

[3] 其他需要准备的物品

除了本产品之外，请准备以下试剂及仪器类。

(1) Realtime PCR 仪器

本产品适用于普通的模块型，高速型及玻璃毛细管型等各种 Realtime PCR 仪器。请按照仪器的使用说明书进行操作。

(2) 文库样品

用于 illumina[®]二代测序的已制备文库样品。

[4] 文库的稀释

(1) 1×Dilution Buffer 的制备

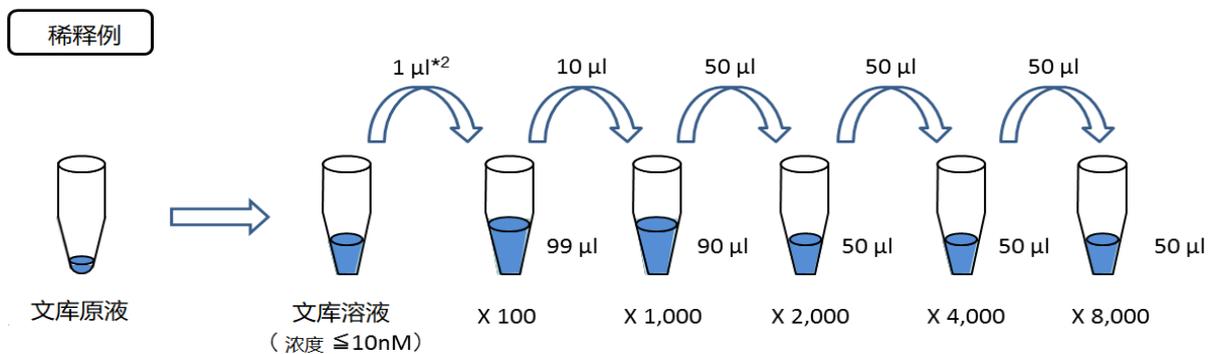
用灭菌水将 50×Dilution Buffer 作 50 倍稀释，制成 1×的 Dilution Buffer。

1×Dilution Buffer 的组成如下所示：10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA、0.1% Tween20

1×Dilution Buffer 仅作文库稀释用。

(2) 文库的稀释

使用 1×Dilution Buffer，在 Standard DNA 1~6 的浓度范围内（20~0.0002 pM \approx 5.5~0.000055 pg/ μ l），对文库样品进行稀释。首先将文库用 1×Dilution Buffer 稀释至 10 nM^{*1} 以下（或者 2.7 ng/ μ l 以下），再依次作 100 倍，1,000 倍、2,000 倍、4,000 倍、8,000 倍的梯度稀释。或者，根据情况制备这些稀释倍数相近的稀释梯度，作定量使用。



*1: 文库稀释至 10 nM 以下时，参考 NanoDropTM、Qubit[®]、或者 Bioanalyzer 等测得的数值进行稀释。根据测定值，求出浓度，文库的平均链长为 450bp 时，2.7ng/ μ l 大约相当于 10nM（文库的平均链长为一半的 225bp 时，2.7ng/ μ l 大约相当于 20nM（10[nM] \times 450[bp]/225[bp]）。另外，同样的实验，如果以前做过时，请参考当时的结果进行稀释。

*2: 1 μ l 左右的量用移液器分装时，请注意精确度。

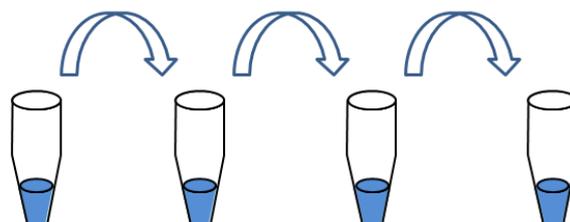
如果没有对照品，文库浓度不能确定时，请参考表 1 进行稀释。

表1

文库类型	稀释方法的选择
通过PCR制备的文库 (Whole Genome Seq、ChIP-Seq、RNA-seq及 Amplicon Sequence用文库等)	· 初次请按10,000、20,000、40,000、80,000倍进行稀释。
Target capture法制备的文库	· 初次请按100,000、200,000、400,000、800,000倍进行稀释。
不通过PCR制备的文库 (Whole Gemome Seq用文库等) (1) 输入100ng~1μg DNA制备的文库 (2) 输入10~100ng DNA制备的文库 (3) 10ng 以下制备的文库	(1) 初次请按5,000、10,000、20,000、40,000倍进行稀释。 (2) 初次请按100、200、400、800倍进行稀释。 (3) 初次请按2、4、8倍进行稀释。

稀释例 (表1)

文库原液



通过PCR制备的文库	X 10,000	X 20,000	X 40,000	X 80,000
通过目的片段捕获 (target capture)制备的文库	X 100,000	X 200,000	X 400,000	X 800,000
不通过PCR制备的文库	X 5,000	X 10,000	X 20,000	X 40,000
	X 100	X 200	X 400	X 800
	X 2	X 4	X 8	

[5] 使用方法

(1) 反应液的制备

以下以 20 μ l 反应体系的制备为例。请按照 Realtime PCR 仪器特性，适当增加或减少反应液的用量。

试剂	20 μ l 反应体系
KOD SYBR [®] qPCR Mix	10 μ l
50 \times ROX reference dye* ¹	0.4 / 0.04 μ l
5 \times Primer Mix	4 μ l
稀释的文库 / Standard DNA	4 μ l
灭菌水	1.6 / 1.96 μ l
合计	20 μ l

*1: 使用 Applied Biosystems[®]、Agilent Technologies 等相关型号的仪器时，为了校正孔间荧光强度及分装误差，反应体系中请添加 passive reference。最适添加量因仪器种类不同而异。主要仪器的添加量如下所示。另外，不进行校正的仪器可以不用添加。

主要仪器的最适 ROX reference dye 浓度

仪器	终浓度 (添加量)
Applied Biosystems [®] 7000、7300、7700、7900HT、StepOne [™] 、StepOnePlus [™] 等	1 \times (1/50 量)
Applied Biosystems [®] 7500、7500Fast、Agilent Technologies 公司的仪器(option)等	0.1 \times (1/500 量)
Roche 公司的仪器、Bio-Rad 公司的仪器、BioFlux LineGene 等	不需要

经常按同一浓度使用 ROX reference dye 时，可以预先将 50 \times ROX reference dye 按以下比例与 KOD SYBR[®] qPCR Mix 混合后保存。

按 1 \times ROX 的浓度使用时

qPCR Mix : 50 \times ROX = 1.67ml : 66.8 μ l

按 0.1 \times ROX 的浓度使用时

qPCR Mix : 50 \times ROX = 1.67ml : 6.7 μ l

(2) PCR 循环条件设定

请按照各仪器的操作流程，按以下循环条件进行设定。融解曲线分析的设定，请按照各仪器的标准进行设定。详细信息，请参考各仪器的使用说明书。

预变性	98°C, 2 min. *1	
变性 :	98°C, 10 sec.	← 35 cycles
退火 :	65°C, 10 sec.	
延伸 :	68°C, 30 sec. *2	
融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)		

*1: 本产品因为使用了抗体，采用了热启动体系，所以请进行 98°C、2min.的预变性，失活抗体。

*2: 600bp 以上的文库时，请设定为 45 sec.。

(3) 产生非特异性扩增时的对策

当融解曲线上出现明显的非特异性扩增时，循环条件请参考 [p.8 \[5\]](#) 使用方法 (2) PCR 循环条件设定，降低循环数，可以提高反应特异性。

预变性	98°C, 2 min.	
变性 :	98°C, 10 sec.	← 35 cycles
延伸 :	68°C, 30 sec.	
融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)		

另外，融解曲线在 82°C 附近出现峰时，可能是接头二聚体(adaptor dimer)导致的。接头二聚体（大约 120bp）由文库制备的连接反应产生，如果混在文库中，就会产生定量值偏差，不能保证定量值的准确性。请用 Bioanalyzer 等电泳仪或通过凝胶电泳确认是否存在。发生这种情况时，推荐再进行一次文库的纯化，去除接头二聚体。

[6] 数据分析

(1)文库浓度的计算方法

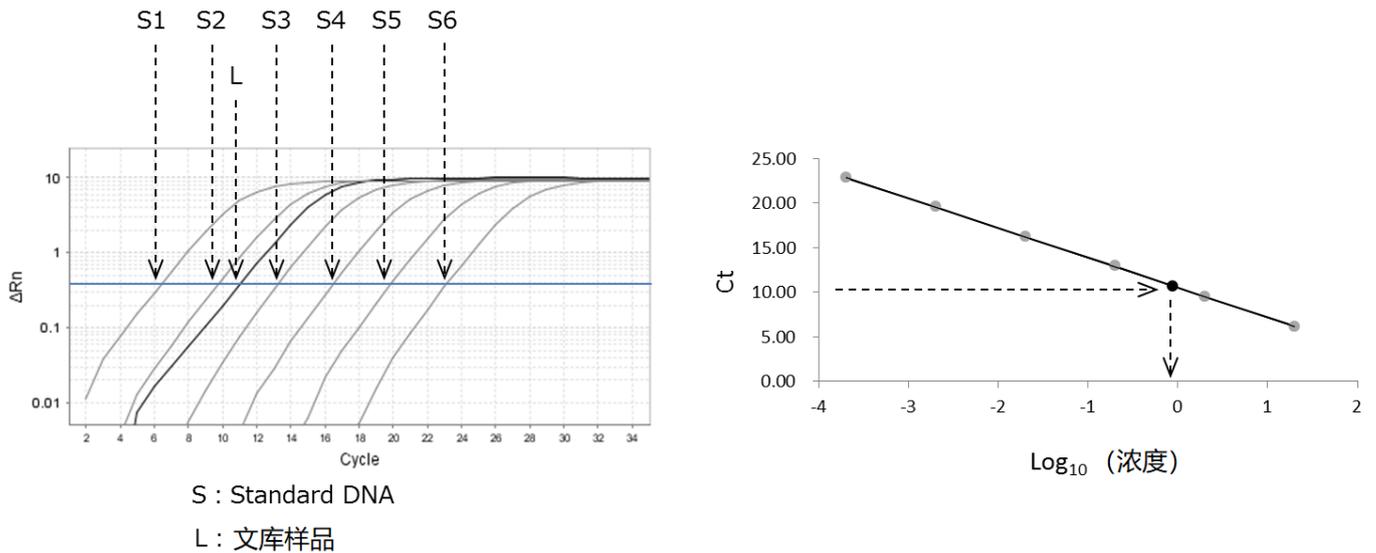
以测得的 Standard DNA 的 Ct 值作标准曲线。请去除明显异常的 Ct 值。

标准曲线由下图浓度（20 pM ~0.0002 pM）的对数值（X 轴：log₁₀ Scale）与测定得到的 Ct 值（Y 轴）组成。使用文库稀释液得到的 Ct 值，作成标准曲线，根据标准曲线计算文库的浓度（pM）。

用上述方法计算得到的浓度是以 Standard DNA 片段长度 452 bp 为标准的值，片段长度不同时，有必要对文库进行校正。使用以下公式进行校正。

$$\text{文库浓度 (nM)} = \frac{[\text{计算出的文库样品的浓度 (pM)}] \times 452 (\text{Standard DNA 片段长度 bp}) \times \text{稀释倍率}}{1000 \times [\text{文库样品平均片段长度 bp}]}$$

请使用定量值在标准曲线范围内的浓度最高的读数（稀释倍数最小的数值）。



[7] 常见问题

现象	原因	对策
二代测序中簇的密度比较低, 或比较高	标准曲线的制作方法有问题	<ul style="list-style-type: none"> · 请除去明显异常的 Ct 再进行计算。 · 请设定适当的 Threshold。
	反应液的制备方法有问题	反应液制备及添加 Standard DNA 时, 请用移液器充分混匀。
	文库的稀释不合适	稀释文库时, 请尽量使其值在 Standard DNA1~6 的范围内 (20~0.0002pM)。如果利用偏离了 Standard DNA1~6 的范围的 Ct 值进行定量, 则不能保证定量值的准确性。
	产生非特异性扩增	请参考 p.8 [6] 数据分析 (3) 产生非特异性扩增时的对策 。
	含有接头二聚体 (adaptor dimer)	请参考 p.8 [6] 数据分析 (3) 产生非特异性扩增时的对策 。有接头二聚体(adaptor dimer)时, 定量值产生偏差, 定量值的准确性不能保证。
只有 Standard DNA 被扩增, 未见文库的扩增	本产品不适于该文库	本产品只能定量含有 illumina®P5、P7 接头序列的文库。
扩增曲线的荧光信号比较弱, 或者扩增曲线的形状不平滑	ROX reference dye 的量过多	使用 passive reference 的仪器, ROX reference dye 的量使用过多时, 荧光量校正时, 有时 SYBR® Green I 的荧光值会看起来比较低。请根据 p.6 [5] 使用方法 (1) 反应液的制备 、来确定 50×ROX reference dye 的添加量。
	荧光测定时间较短	一些仪器, 在 PCR 延伸时间比较短时, 有时会出现荧光测定不充分。扩增曲线的间隙比较明显时, 通过延长延伸时间(45~60 秒), 有时可以得到改善。
	反应液的量比较少	用仪器推荐的反应液的量以下的量进行反应时, 有可能会增大荧光测定值的误差。请增加反应液的量以进行反应。

[8] 相关产品

高效率 SYBR® Green I 检测体系用 Realtime PCR 试剂

产品名	容量	Code No.
SYBR® Green I 检测体系用 Realtime PCR 试剂 KOD SYBR® qPCR Mix	1ml×1 (40 次用)	QKD-201T
	1.67ml×3 (200 次用)	QKD-201

※KOD SYBR® qPCR Mix 中的 50×ROX reference dye 是独立包装的。

※容量是按 50μl 反应时的反应次数。

详细信息，请浏览本公司网页

◆东洋纺（上海）生物科技有限公司网页◆

<http://www.bio-toyobo.cn>



[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[生产商]

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号