

# **VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina®**

## **NQ101-NQ106**



**[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)**

Vazyme biotech co., ltd.

---

### **使用说明书**

Version 7.1

# 目 录 Contents

01/产品概述	02
02/保存条件	02
03/适用范围	02
04/产品组分	03
05/注意事项	04
06/使用方法	06
07/数据分析	06
08/参考实例	08
09/常见问题及解决方案	09

## 01/产品概述

本品是使用染料qPCR法进行Illumina®平台高通量测序文库浓度测定的专用试剂盒。其工作原理为使用标准品绘制标准曲线，再根据标准曲线计算待测文库绝对浓度。试剂盒采用了一种基于抗体法热启动的新型染料法qPCR预混液VAHTS™ SYBR® qPCR Master Mix。该预混液具有特异性高、扩增效率高、GC含量适应性广、检测灵敏度高等诸多优势，非常适合进行文库浓度的绝对定量。试剂盒所提供的所有试剂都经过了严格的质量控制，最大程度上保证了不同批次间实验结果的可重复性。

## 02/保存条件

所有组分应置于-20℃保存，Master Mix与ROX应避光。

▲试剂在30个冻融循环内可以保持性能不下降；如短期内反复使用，Library Dilution Buffer和Master Mix可解冻后于4℃暂存，Master Mix应避光，有效期三个月。

## 03/适用范围

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。不论以何种方式构建，只要文库末端包含Illumina® P5和P7芯片结合序列、长度不超过1 kb且浓度不低于0.0002 pM，都可以使用本品进行绝对定量。此外，本品还可用于检测实验环境中文库污染程度。试剂盒提供的qPCR Primer Mix中包含如下两种引物序列：

Primer 1: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

Primer 2: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-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。

04/产品组分

组分	包装量	NQ101	NQ102	NQ103	NQ104	NQ105	NQ106
VAHTS SYBR qPCR Master Mix	4 × 1.25 ml	√	√	---	---	---	---
VAHTS SYBR qPCR Master Mix (Low ROX Premixed)	4 × 1.25 ml	---	---	√	---	---	---
VAHTS SYBR qPCR Master Mix (High ROX Premixed)	4 × 1.25 ml	---	---	---	√	---	---
qPCR Primer Mix	2 × 0.5 ml	√	√	√	√	---	---
50 × ROX Reference Dye 1	200 µl	√	---	---	---	---	---
50 × ROX Reference Dye 2	200 µl	√	---	---	---	---	---
DNA Standard 1-6	6 × 96 µl	---	---	---	---	√	---
Library Dilution Buffer	50 ml	---	---	---	---	---	√

包装说明

1.NQ101、NQ102、NQ103、NQ104为扩增组分试剂盒，包含VAHTS SYBR qPCR Master Mix、qPCR Primer Mix以及单独包装ROX (仅NQ101)，包装量足够进行500次定量反应(20 µl reaction)；NQ105为标准品试剂盒，包含DNA Standard 1-6，包装量可用于8次标准曲线绘制(3孔重复)；NQ106为文库稀释液试剂盒，包含50 ml Library Dilution Buffer。

2.根据反应时ROX Reference Dye是否需要添加及需要添加的种类分类，主流定量PCR仪可分为以下三类：

Type I 机型：不添加ROX Reference Dye	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Cepheid SmartCycler®; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Roche Applied Science LightCycler™ 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler.
Type II 机型：添加ROX Reference Dye 1	Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOnePlus™.
Type III 机型：添加ROX Reference Dye 2	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™.

NQ101试剂盒中提供单独包装的ROX Reference Dye 1/2，适用于所有定量PCR仪。使用时根据上表选择适合的ROX Reference Dye；

NQ102试剂盒中无单独包装或预混ROX Reference Dye，适用于上表Type I 机型定量PCR仪；

NQ103试剂盒中的扩增预混液已预混Low ROX (ROX Reference Dye 2)，适用于上表Type III 机型定量PCR仪；

NQ104试剂盒中的扩增预混液已预混High ROX (ROX Reference Dye 1)，适用于上表Type II 机型定量PCR仪。

## 05/注意事项

### 05-1/移液注意事项

因qPCR反应极其灵敏，移液的准确程度对反应结果影响显著。开始实验前，请务必仔细阅读以下内容：

1. 所有组分应充分解冻并彻底摇匀、短暂离心收集液体至管底后开盖使用；
2. 高浓度DNA溶液粘稠，DNA分子分散度较差，应避免直接进行大体积稀释(如一次性稀释10,000倍)，推荐进行多次小体积稀释。如：需对文库进行10,000倍稀释，可将文库进行两次100倍连续稀释；
3. 尽量使用带滤芯的枪头，以避免气溶胶污染；
4. 尽量避免使用排枪；
5. 每次移液都应更换枪头，避免产生交叉污染；
6. 试剂吸取时避免枪头过度深入液体，以免粘液；
7. 排出液体时，枪头应尽可能接近反应管管底；
8. 排完液体后应继续上下吹打2-3次漂洗枪头；
9. 液体完全排出后，应仔细检查确认枪头内无液体残留。

### 05-2/文库浓度和稀释度

文库必须稀释至标准曲线有效 $C_T$ 范围内进行定量反应。浓度计算时，有效 $C_T$ 范围之外的 $C_T$ 不应用于计算。如文库只有一个稀释度，应重新稀释合适倍数后重复试验；如文库有多个稀释梯度，选取有效范围内 $C_T$ 进行浓度计算。标准曲线有效 $C_T$ 范围选取方案参见07/数据分析。文库稀释可参照过往经验或使用其他测定方式测定的浓度作为参考进行。下表为可定量文库浓度范围：

摩尔浓度：	20 - 0.0002 pM
质量浓度：	5.5 - 0.000055 pg/ $\mu$ l
拷贝数浓度：	$12 \times 10^6$ - $12 \times 10^1$ copies/ $\mu$ l

### 05-3/文库稀释

应使用稀释液(自行配制，10 mM Tris-HCl, pH 8.0 @25°C, 0.05% Tween 20；或从Vazyme购买，#NQ106)进行DNA稀释，请勿使用水作为稀释液。文库应现用现稀释，用完丢弃；qPCR反应之前，应将稀释后的文库和解冻后的DNA Standards置于冰上存放。

### 05-4/污染与无模板阴性对照(NTC, No Template Control)

1. PCR产物因操作不当极易产生污染，进而导致定量结果不准确、可信度不高等问题。推荐将反应体系配制区和模板制备区进行物理隔离、使用专用的移液器等设备、使用带滤芯的枪头、并定时对各实验区域进行清洁(使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理)。
2. 反应体系配制过程中DNA Standards的加入应按照从低浓度至高浓度(DNA Standard 6至1)的顺序进行，每次移液都应更换新的枪头，以避免气溶胶污染。
3. 每次实验都应平行进行NTC阴性对照反应，配合融解曲线进行扩增特异性和体系污染程度分析。因扩增引物序列为Illumina平台固定序列而非qPCR专用引物序列，且反复进行文库稀释定量时气溶胶污染无法完全避免，NTC阴性对照反应出现扩增进而产生 $C_T$ 属正常情况。先根据NTC阴性对照确定标准曲线有效 $C_T$ 范围(方案参见07/数据分析)，再进行标准曲线绘制和浓度计算。

### 05-5/扩增曲线基线设置

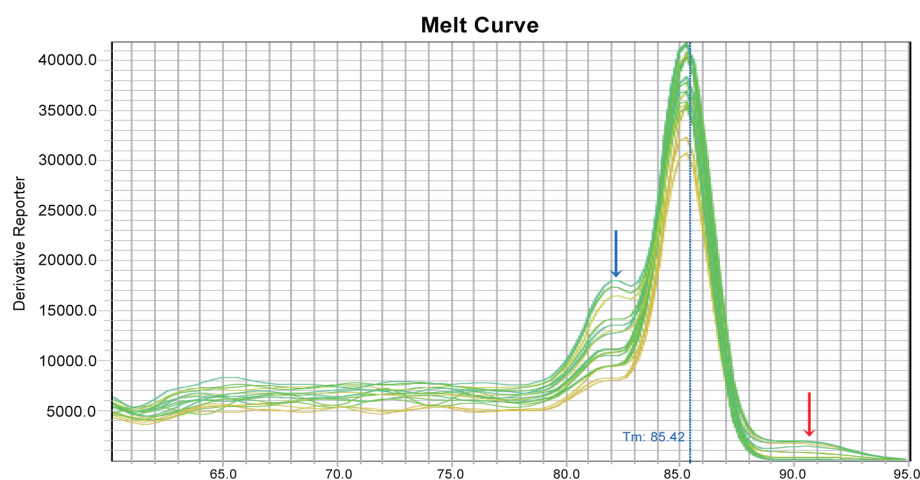
因DNA Standard 1的摩尔浓度远远高于常规qPCR模板，其 $C_T$ 往往非常小(7~9)。而大部分qPCR仪器都默认将3-15循环设置为基线(Baseline)，有时会造成DNA Standard 1的 $C_T$ 错误的增高，进而影响标准曲线的线性关系。手动设置基线(Baseline)为1-3循环可以有效避免这种情况发生。

### 05-6/文库浓度长度矫正

荧光染料SYBR® Green I结合DNA后产生的荧光强度与DNA分子量成正比。例如：两个250 bp的双链DNA分子产生的荧光强度与一个500 bp的双链DNA分子产生的荧光强度相当。因此，在进行文库浓度绝对定量时，必须根据DNA Standards的长度(452 bp)和文库平均长度对文库摩尔浓度进行长度矫正(方案参见07/数据分析)。

### 05-7/融解曲线分析

融解曲线在配合NTC阴性对照进行污染程度分析以及确认标准曲线最大有效 $C_T$ 时至关重要，推荐每次实验都进行融解曲线采集步骤。DNA Standards产生的融解曲线呈现特征双峰(下图蓝色箭头标记)。造成双峰的原因为DNA Standards (452 bp dsDNA)的不同位置在不同温度下解链，而不是非特异性扩增产物。此外，DNA Standard 1-3 摩尔浓度极高，循环结束时扩增产物过多，会导致部分产物在 $T_m$ 附近无法完全解链。因此，DNA Standard 1-3产生的融解曲线有时会出现翘尾现象(下图红色箭头标记)，属正常情况。



### 05-8/其他定量方法

高通量测序文库有多种浓度测定方式，如光谱测定法(NanoDrop™等)、荧光染料法(Qubit®、PicoGreen®等)、电泳检测法(2100 Bioanalyzer、TapeStation、LabChip® GX等)、qPCR检测法等。其中，qPCR检测法因只测定可扩增文库(双端接头完整)，测定值与真实值最接近。一般来说，qPCR法测定的文库浓度会比其他方法略低一些，可使用其他方法粗略测定的文库浓度作为参考，选取合适的文库稀释度进行qPCR法浓度测定。然而，当文库被过度扩增时(如扩增循环数太多)，扩增产物中大量存在的非严谨型退火产物(部分双链)会导致qPCR法测定的文库浓度会比其他方法高一些。此时，若使用其他方法粗略测定的文库浓度作为稀释参考，会出现文库稀释度不足的情况。

06/使用方法

- 1. 准备适量文库稀释液(参见05/注意事项 05-3/文库稀释)。文库稀释液可于4℃保存。使用前置于室温孵育30 min；用完后放回4℃保存。
- 2. 使用稀释液将文库进行适度稀释。文库浓度不同，最佳稀释倍数不尽相同。推荐稀释度为1/1,000-1/100,000，并至少设置一个额外的2倍稀释，如1/10,000和1/20,000。文库应现用现稀释，稀释后置于冰上备用，用完丢弃。
- 3. 解冻VAHTS SYBR qPCR Master Mix (Without ROX, Low ROX Premixed or High ROX Premixed)、qPCR Primer Mix、ROX Reference Dye (如需要)、DNA Standard 1-6，解冻后上下颠倒充分混匀，并短暂离心将溶液收集至管底，置于冰上备用。用完后立即放回-20℃保存。
- 4. 在qPCR管中配制如下反应：

VAHTS SYBR qPCR Master Mix (Without ROX, Low or High ROX Premixed)	10.0 µl
qPCR Primer Mix	2.0 µl
ROX Reference Dye 1/2 <sup>a</sup>	0.4 µl
DNA Standard 1-6或稀释后的文库或灭菌蒸馏水 <sup>b</sup>	4.0 µl
灭菌蒸馏水 <sup>c</sup>	To 20.0 µl

- a 仅使用NQ101产品时，根据qPCR机型选择合适ROX添加；使用其他试剂盒时请勿添加，将该组分用灭菌蒸馏水代替即可。
- b 在NTC阴性对照反应管中加入灭菌蒸馏水；在样品反应管中加入稀释后的文库；在标准曲线反应管中加入DNA Standards。加入DNA Standards时，应按照DNA Standard 6至1的顺序（低浓度至高浓度）依次加入，以免气溶胶污染影响标准曲线的线性。
- c 推荐进行20 µl反应。如需进行10 µl反应，可将体系各组分等比减少即可。

- 5. 按照下述条件进行qPCR反应：

Stage 1	预变性	Reps: 1	95℃	5 min
Stage 2	循环反应 <sup>a</sup>	Reps: 35	95℃	30 sec
			60℃	45 sec
			95℃	15 sec
Stage 3	融解曲线 <sup>b</sup>	Reps: 1	60℃	60 sec
			95℃	15 sec

- a 如文库平均长度超过600 bp，应将退火延伸时间由45 sec延长至90 sec。
- b 不同仪器融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认程序即可。

07/数据分析

07-01/标准曲线制作

- 1.根据复孔间C<sub>T</sub>差异≤0.2的原则，对DNA Standards原始C<sub>T</sub>进行过滤，并计算平均C<sub>T</sub>。  
如移液操作足够精确，三个复孔之间的C<sub>T</sub>差异均应不超过0.2。如果两个复孔C<sub>T</sub>比较接近，与第三个复孔之间的C<sub>T</sub>差异较大，可删除第三个复孔数据，使用前两个复孔的C<sub>T</sub>计算平均C<sub>T</sub>。  
如多个复孔之间的C<sub>T</sub>差异均超过0.2，需重复实验。



**2. 参照NTC阴性对照C<sub>T</sub>确认标准曲线C<sub>T</sub>有效范围。**

如C<sub>T</sub> (NTC) > C<sub>T</sub> (DNA Standard 6) + 3, 则最大有效C<sub>T</sub>为C<sub>T</sub> (DNA Standard 6), 应使用DNA Standard 1-6所产生的C<sub>T</sub>绘制标准曲线;

如C<sub>T</sub> (DNA Standard 6) + 3 > C<sub>T</sub> (NTC) > C<sub>T</sub> (DNA Standard 5) + 3, 则最大有效C<sub>T</sub>为C<sub>T</sub> (DNA Standard 5), 应使用DNA Standard 1-5所产生的C<sub>T</sub>绘制标准曲线;

如C<sub>T</sub> (DNA Standard 5) + 3 > C<sub>T</sub> (NTC) > C<sub>T</sub> (DNA Standard 4) + 3, 则最大有效C<sub>T</sub>为C<sub>T</sub> (DNA Standard 4), 应使用DNA Standard 1-4所产生的C<sub>T</sub>绘制标准曲线;

基于定量准确性考虑, 请至少使用4个C<sub>T</sub> (DNA Standards)绘制标准曲线。如C<sub>T</sub> (DNA Standard 4) + 3 > C<sub>T</sub> (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. 绘制标准曲线。**

使用有效范围内的C<sub>T</sub> (作为纵坐标)和下表对应Log[pM](作为横坐标)绘制标准曲线。绘制的标准曲线相关系数R<sup>2</sup>应不低于0.99, 斜率应位于-3.1~-3.6之间(表示扩增效率位于90%~110%之间)。如标准曲线参数不佳, 应重复试验。

Standard名称	Standard摩尔浓度	Standard质量浓度	Log[pM]
DNA Standard 1	20 pM	5.5 pg/μl	Log[20]
DNA Standard 2	2 pM	0.55 pg/μl	Log[2]
DNA Standard 3	0.2 pM	0.055 pg/μl	Log[0.2]
DNA Standard 4	0.02 pM	0.0055 pg/μl	Log[0.02]
DNA Standard 5	0.002 pM	0.00055 pg/μl	Log[0.002]
DNA Standard 6	0.0002 pM	0.000055 pg/μl	Log[0.0002]

▲表中所列Standard浓度非反应终浓度。只要DNA Standards和稀释文库使用体积一致, 无需换算反应终浓度。

**07-02/文库浓度计算**

**1. 根据复孔间C<sub>T</sub>差异≤0.2的原则, 对稀释文库原始C<sub>T</sub>进行过滤, 并计算平均C<sub>T</sub>。**

如移液操作足够精确, 三个复孔之间的C<sub>T</sub>差异均应不超过0.2。如果两个复孔C<sub>T</sub>比较接近, 与第三个复孔之间的C<sub>T</sub>差异较大, 可删除第三个复孔数据, 使用前两个复孔的C<sub>T</sub>计算平均C<sub>T</sub>。如三个复孔之间的C<sub>T</sub>差异均超过0.2, 需重复实验。

**2. 根据标准曲线计算稀释文库的浓度(pM)。**

稀释文库的C<sub>T</sub>只有位于标准曲线有效C<sub>T</sub>范围之内才可用于浓度计算。请勿使用标准曲线有效C<sub>T</sub>范围之外的C<sub>T</sub>计算稀释文库的浓度。

**3. 根据下述公式对稀释文库的浓度(pM)进行长度矫正。**

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

**4. 根据下述公式计算原始文库浓度(nM)。**

原始文库浓度(nM) = 矫正后的稀释文库浓度(pM) × 稀释倍数/1,000



08/参考实例

◇ 初始材料

VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina® (Vazyme #ND601)制备的两个插入长度约350 bp的DNA文库(文库总长度~470 bp)。经Agilent Bioanalyzer 2100 High Sensitivity DNA Assay检测获得文库的长度、浓度信息见Table 2。

◇ 文库稀释

- 将两个文库分别进行1/10,000稀释(两次1/100)和1/20,000稀释(1/10,000稀释产物再稀释一倍)。
- a. 根据复孔间C<sub>T</sub>差异≤0.2的原则，过滤DNA Standards原始C<sub>T</sub>。去除DNA Standard 6第三个重复孔数据(Table 1, “C<sub>T</sub>”列)，并计算平均C<sub>T</sub> (Table 1, “平均C<sub>T</sub>”列)。
  - b. 根据C<sub>T</sub> (NTC)确认最大有效C<sub>T</sub>为C<sub>T</sub> (DNA Standard 6)，使用平均C<sub>T</sub> (DNA Standard 1-6)与其对应的摩尔浓度对数值(Table 1, “Log[pM]”列)绘制标准曲线(Figure 1)。

Table 1. DNA Standards的C<sub>T</sub>值

DNA Standard	Log[pM]	C <sub>T</sub>	平均C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
1	Log[20]	8.37	8.33	-
		8.36		
		8.27		
2	Log[2]	11.83	11.78	3.45
		11.74		
		11.78		
3	Log[0.2]	15.26	15.22	3.44
		15.28		
		15.12		
4	Log[0.02]	18.78	18.70	3.48
		18.73		
		18.59		
5	Log[0.002]	22.16	22.10	3.40
		22.05		
		22.10		
6	Log[0.0002]	25.51	25.49	3.39
		25.47		
		25.17		
NTC	-	30.87	30.95	-
		31.26		
		30.73		

\*ΔC<sub>T</sub>应位于3.1-3.6之间。

◇ 文库浓度计算

- a. 根据复孔间C<sub>T</sub>差异≤0.2的原则，过滤稀释文库原始C<sub>T</sub>。去除Library 2 1/20,000稀释组第二个重复孔数据(Table 2, “Library2, 1/20,000”列)，并计算平均C<sub>T</sub> (Table 2, 第5行)。
- b. 根据标准曲线计算稀释文库的浓度(Table 2, 第7行)。
- c. 根据文库平均长度，计算矫正后的稀释文库浓度(Table 2, 第8行)。
- d. 根据稀释倍数计算各稀释度初始文库浓度(Table 2, 第9行)和平均初始文库浓度(Table 2, 第11行)。

Figure 1. Standard Curve

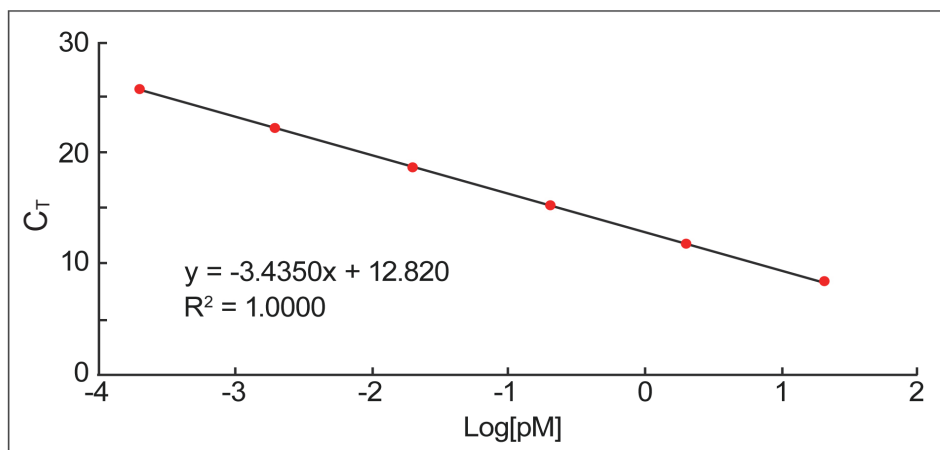


Table 2. 文库定量数据表

行	名称	Library 1		Library 2	
1	文库平均总长度(Bioanalyzer)	475 bp		470 bp	
2	文库近似浓度(Bioanalyzer)	25.74 ng/μl = 82.08 nM		36.22 ng/μl = 116.77 nM	
3	文库稀释倍数	1/10,000	1/20,000	1/10,000	1/20,000
4	复孔C <sub>T</sub>	9.91	10.82	9.15	10.31
		9.95	10.93	9.24	10.03
		9.88	10.89	9.25	10.28
5	平均C <sub>T</sub>	9.91	10.88	9.21	10.30
6	ΔC <sub>T</sub>	0.97		1.09	
7	稀释文库计算浓度(pM)	7.03	3.67	11.24	5.42
8	长度矫正后的稀释文库浓度(pM)	6.69	3.49	10.81	5.21
9	初始文库浓度(nM)	66.93	69.86	108.14	104.16
10	不同稀释度文库定量差	4.4%		3.8%	
11	平均初始文库浓度	68.40 nM = 21.45 ng/μl		106.15 nM = 32.93 ng/μl	

## 09/常见问题及解决方案

### ◇ 扩增效率偏出90%~110%范围

- ① 如 $C_T(\text{NTC}) - C_T(\text{DNA Standard 6}) < 3$ 或者 $C_T(\text{DNA Standard 6}) - C_T(\text{DNA Standard 5}) < 3.1$ , 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 $C_T(\text{NTC})$ 确定标准曲线有效 $C_T$ 值范围, 舍弃受污染影响的 $C_T$ , 使用剩余的 $C_T$ 绘制。
- ② 不恰当的基线(Baseline)设置会增大 $C_T(\text{DNA Standard 1})$ , 进而影响扩增效率计算。手动调整基线(Baseline)为1-3循环。
- ③ 移液精确度差。

### ◇ $R^2 < 0.99$

- ① 移液精确度差。
- ② 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。
- ③ 仪器相关问题。确认所用ROX Reference Dye与定量仪器匹配。

#### ◇ 标曲扩增曲线分布不均一

- ①  $C_T$  (DNA Standard 6) -  $C_T$  (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)。
- ②  $C_T$  (DNA Standard 2) -  $C_T$  (DNA Standard 1) < 3.1, 提示基线(Baseline)设置不当。手动调整基线(Baseline)为1-3。
- ③ DNA Standards之间的 $\Delta C_T$  > 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。
- ④ 长时间强光照射会导致VAHTS SYBR qPCR Master Mix荧光值下降, 进而造成 $\Delta C_T$  > 3.6。应按照推荐方式避光贮存试剂。

#### ◇ 复孔重复性差

- ① 移液精确度差。
- ② 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。
- ③ 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 $\Delta C_T$ 与稀释倍数差异不一致

- ① 移液精确度差。
- ② 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。
- ③ 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。
- ④ 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%

- ① 移液精确度差。
- ② 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。
- ③ 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。
- ④ 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 $C_T$ 超过标准曲线有效 $C_T$ 范围

- ①  $C_T$  (稀释文库) <  $C_T$  (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。
- ②  $C_T$  (稀释文库) >  $C_T$  (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 $C_T$  不应超过 $C_T$  (DNA Standard 6)。减少稀释倍数重复实验。

#### ◇ DNA Standard 1 $C_T$ 异常

不恰当的基线(Baseline)设置会增大 $C_T$  (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。

#### ◇ DNA Standards有扩增, 而文库没有或 $C_T$ 很大

- ① 文库接头序列错误: 建议核对文库末端序列与试剂盒提供的引物序列是否匹配。
- ② 稀释度过高: 建议减少稀释倍数, 重复实验。
- ③ 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。



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Tel: 400-600-9335

Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



企业已通过ISO 9001:2015  
国际质量管理体系认证

