

测序文库qPCR定量指南

仅供研究使用

介绍	3
定量工作流程	4
最佳做法	5
耗材和器械	6
选择控制模板	8
稀释qPCR对照模板	9
稀释文库	11
制备反应混合物	12
等分至48孔板	13
通过qPCR定量	15
分析库	16
附录A – 群集计数	18
附录B – 制备DNA模板20附录C – 文库GC内容	23
技术援助	27



本文件及其内容归Illumina, Inc.所有。及其附属公司（Illumina），并且仅用于其客户在使用本文所述产品时的合同用途，而不适用于其他目的。未经Illumina事先书面同意，不得将本文件及其内容用于任何其他目的和/或以任何方式传播、披露或复制。Illumina并未通过本文档转让其专利、商标、版权或普通法权利或任何第三方的类似权利下的任何许可。

合格且经过适当培训的人员必须严格、明确地遵循本文件中的说明，以确保正确、安全地使用本文所述产品。在使用此类产品之前，必须完全阅读和理解本文件的所有内容。

未完全阅读并明确遵守此处包含的所有说明可能会导致产品损坏、人员伤害（包括用户或其他人）以及其他财产损失。

ILLUMINA不承担因不当使用此处所述产品（包括其部件或软件）或在明确书面许可范围之外使用此类产品而产生的任何责任，

ILLUMINA授予的与客户购买此类产品有关的许可。

仅供研究使用

© 2009-2011 Illumina公司All rights reserved.

Illumina、illuminaDx、Solexa、Making Sense Out of Life、Oligator、Sentrix、GoldenGate、GoldenGate Indexing、DASL、BeadArray、Array of Arrays、Infinium、BeadXpress、VeraCode、IntelliHyb、iSelect、CSPro、GenomeStudio、Genetic Energy、HiSeq、HiScan、Eco、TruSeq和MiSeq是Illumina, Inc.的注册商标或商标。此处包含的所有其他品牌和名称均为其各自所有者的财产。

介绍

本文件描述了一种qPCR方法，用于定量使用Illumina sample制备方案和EcoReal - Time PCR系统生成的合成测序（SBS）文库。qPCR是一种基于PCR的DNA定量方法。qPCR跟踪作为PCR循环数的函数的靶浓度，以获得样品中初始模板浓度的定量估计值。与传统的PCR一样，它使用聚合酶，dNTP和两个设计用于匹配模板内序列的引物。

出于该方案的目的，引物匹配位于Illumina测序文库侧翼的衔接子内的序列。因此，qPCR是用于在产生簇之前测量文库的理想方法，因为它将仅测量在任一末端上具有两个衔接子序列的模板，其随后将在流动池上形成簇。此外，qPCR是一种非常灵敏的测量DNA的方法，因此浓度低于常规分光光度法检测阈值的稀释文库可通过qPCR进行定量。

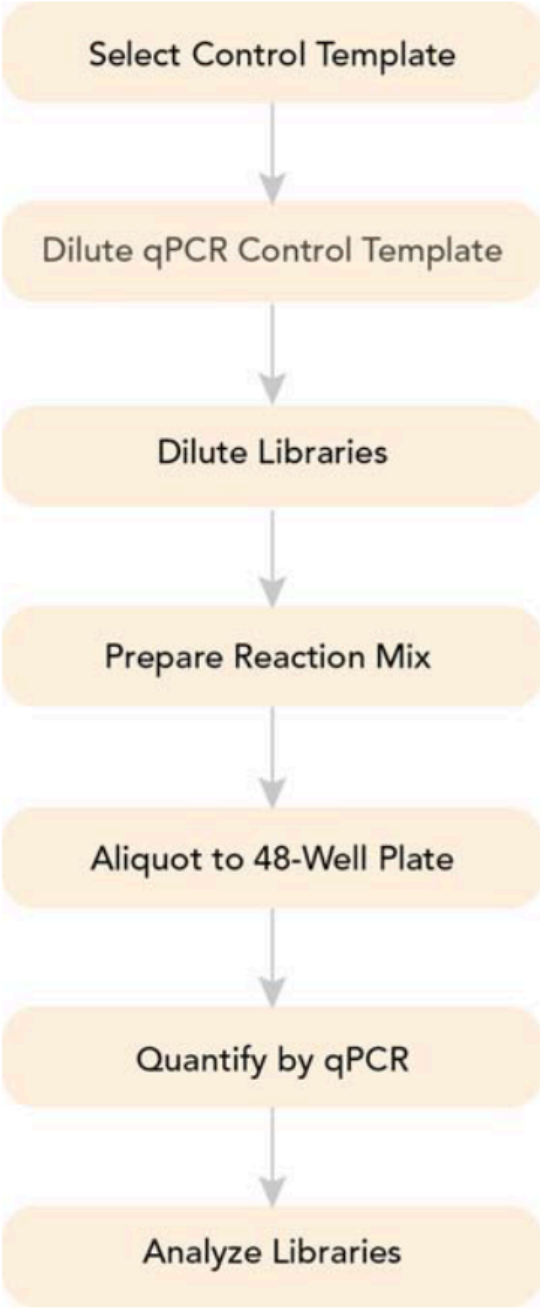
范围

本文档描述了为Eco真实的-时间系统设计的协议。但是，有几种不同的qPCR仪器可用于运行实验和分析数据。当使用Eco以外的qPCR平台时，您需要调整此方案。有关Eco的更多信息，请参阅Illumina Eco系统用户指南。

定量工作流程

下图说明了测序文库qPCR定量工作流程。将对照模板和用于定量的文库稀释至pM范围并运行qPCR。根据qPCR结果，计算定量文库的浓度并将其稀释至标准浓度（例如，2nM）。

图1 测序文库qPCR定量工作流程



最佳做法

在准备测序文库时，应始终遵循良好的分子生物学实践。

- 、 在qPCR设置过程中，避免DNA交叉污染非常重要。用0.5%次氯酸钠（10%漂白剂）彻底清洁设置区域，包括所有待使用的设备。
- 、 始终佩戴手套并使用无菌技术。
- 、 使用专用移液器组进行qPCR，以尽量减少污染。
- 、 qPCR的准确度高度依赖于准确的移液和溶液的彻底混合。在qPCR设置期间和准备用于聚类的模板时，应格外小心，以避免移液错误。

耗材和器械

检查以确保您在继续之前拥有所有必要的用户提供的耗材和设备。

表1用户提供的耗材

消耗品	供货商
0.1%吐温20	一般实验室供应商
0.2 ml八管条	一般实验室供应商
0.5%次氯酸钠（10%漂白剂）	一般实验室供应商
2 N NaOH	一般实验室供应商
对照模板（2 nM）	一般实验室供应商
Eco 48孔板	标签：#EC—200—1002
环保密封胶	标签：#EC—200—1003
杂交缓冲液	Illumina，catalog #0801—1001
KAPA SYBR FAST Master Mix通用2X qPCR Master Mix（2 x 5 ml =10 ml）	Kapa Biosystems，部件编号KK 4602
待定量的文库稀释至约10 nM	一般实验室供应商
无核酸酶水	一般实验室供应商
QIAGEN EB 250 ml洗脱液	QIAGEN，部件编号19086
qPCR引物1.1：5 μ AATGATACGGCGACCACCGAGAT 3 μ HPLC纯化	一般实验室供应商
qPCR引物2.1：5 μ g CAAGCAGAAGACGGCATACGA 3 μ g HPLC纯化	一般实验室供应商
Tris - Cl 10 mM，pH 8.5	一般实验室供应商

表1用户提供的耗材（续）

消耗品	供货商
一种或多种以下试剂盒，以对应于待定量的文库数量：	
1.单读群集生成试剂盒（1个流动池）	1. Illumina， catalog #GD—1003—4001
2.单读群集生成套件（10个流动池）	2. Illumina， catalog #GD—1003—4010
3.双端簇生成试剂盒（1个流动池）	3.标签： #PE—2003—4001
4.双端簇生成试剂盒（5个流动池）	4.标签： #PE—2003—4005

表2用户提供的设备

设备	了建议的供应商
带外摆转子的台式离心机	索瓦尔传奇RT
台式微量离心机	一般实验室供应商
Eco真实的实时PCR系统（110 V）或Eco真实的实时PCR系统（220 V）	Illumina， catalog #EC—100—1000（110 V） Illumina， catalog #EC—100—1001（220 V） 说明书
涡旋器	一般实验室供应商

选择控制模板

在开始qPCR之前，选择对照模板，可以针对其测量用于定量的文库。在Illumina平台上为测序准备的任何文库都可以用作qPCR的对照，您可以定制对照模板以满足您的特定需求。对照模板应在模板大小、GC含量和文库类型（例如，基因组、ChIP-Seq等）。同样重要的是，如本方案所述，有足够量的对照模板可用于多个qPCR反应。

为了将文库浓度与簇数相关联，建议为对照模板生成滴定流通池（参见附录A-簇计数和附录B-制备DNA模板）。

给定文库的GC含量并不总是已知的，这对于将文库与用于测序文库qPCR定量的适当对照模板匹配可能是一个问题。然而，可以通过进行有限数量的qPCR循环，然后是解离曲线来估计Illumina文库相对于相同模板大小的其他Illumina文库的GC含量。文库的GC含量越高，PCR产物的解链温度越高（见附录C-

Library GC Content）。一旦文库的GC含量已知，就可以选择适当的对照模板用于测序文库qPCR定量。

稀释qPCR对照模板

对您希望量化的库使用适当的对照库。



NOTE
Illumina建议使用一个对照库，当聚类在2-20 pM之间时，该库提供了一个良好的聚类数范围。

用户提供的耗材

- 室温下储存的0.1%吐温20（例如，50 ml水+ 50 μ l吐温20）
- qPCR对照模板（2 nM）



NOTE
将qPCR 2 nM文库模板以小等分试样储存，以避免多次冻融循环。

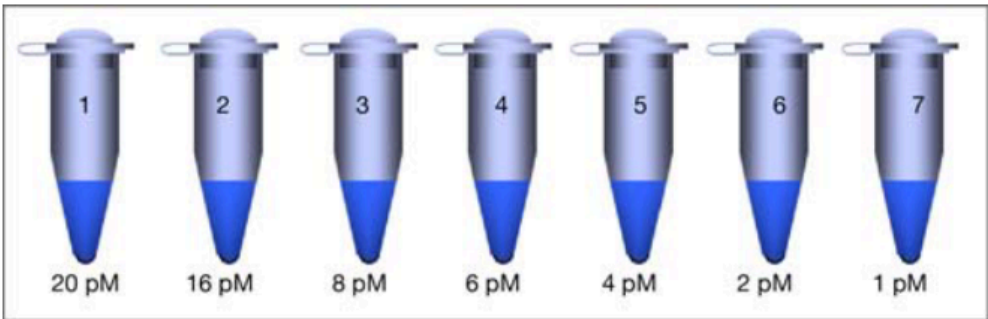
程序

- 向2 μ l qPCR对照模板中加入198 μ l 0.1%吐温20，稀释100倍。
- 涡旋稀释液以充分混合样品。
- 向100 μ l稀释模板中加入100 μ l 0.1%吐温20，绘制6份2x系列稀释液的滴定曲线，以制备7份20-1 pM范围内的对照模板稀释液。



NOTE
在qPCR之前立即制备qPCR对照模板的新鲜稀释液非常重要，因为DNA在低浓度下不能很好地储存。

图2系列稀释



- 4 涡旋稀释液以充分混合样品。
- 5 重复步骤1-4，制备对照模板的三份独立系列稀释液。



NOTE

将对照稀释液进一步稀释10倍至最终SYBR混合物中，因此qPCR中的最终浓度为2-0.03 pM。

稀释文库

该过程将用于定量的文库稀释至与用于qPCR的对照模板相同的范围。

用户提供的耗材

- 、 室温下储存的0.1%吐温20（例如，50 ml水+ 50 μ l吐温20）
- 、 在QIAGEN EB缓冲液中稀释至约2 nM的定量文库



NOTE

重要的是在qPCR之前制备qPCR未知文库模板的新鲜稀释液，因为DNA在低浓度下不能很好地储存。

程序

- 1 向2 μ l未知文库模板中加入998 μ l 0.1%吐温20，稀释500倍，浓度约为4 pM。
- 2 涡旋稀释液以充分混合样品。
- 3 重复步骤1-2，制备文库模板的三份独立稀释液。
qPCR的三次检测结果对于后续分析很重要。



NOTE

将未知样品稀释液进一步稀释10倍至最终SYBR混合物中，因此qPCR中的最终浓度约为0.4 pM。

制备反应混合物

制作主混合液以尽量减少移液错误是很重要的。该过程制备了足够的主混合物以填充48孔板。

用户提供的耗材

- 、 KAPA SYBR FAST MASTER MIX UNIVERSAL (2x)
- 、 qPCR引物1.1
- 、 qPCR引物2.1
- 、 无核酸酶水

程序

- 1 如下制备SYBR主混合物反应混合物。主混合液含有额外体积，可容纳多达55个威尔斯孔：

消耗品		μl/孔μl/板	
KAPA SYBR FAST MASTER MIX UNIVERSAL (2x)	10其它	550	
qPCR引物1.1 (10 μM)		0.2	11
qPCR引物2.1 (10 μM)		0.2	11
无核酸酶水		7.6	418
总体积		18	990

- 2 轻轻混合，但要彻底。
- 3 将反应混合物置于冰上，避光保存直至使用。

等分至48孔板

该过程等分对照模板稀释液、未知文库稀释液和主混合物。尽可能准确地移液非常重要，因为体积的微小变化会极大地影响qPCR结果。

用户提供的耗材

- 、 48孔板
- 、 对照模板稀释液（参见稀释qPCR对照模板）
- 、 环保密封胶
- 、 用于定量稀释的库（参见稀释库）
- 、 反应混合物（参见制备反应混合物）

程序

- 1 使用多通道移液器向48孔板的每个孔中加入18 μ l主混合物。注意准确移取至威尔斯孔中，因为体积变化会影响测定。
- 2 向48孔板的每个孔中加入2 μ l对照模板稀释液、未知文库稀释液或水。注意准确移取至威尔斯孔中，因为微小变化会影响测定。例如，48孔板可以如下填充：

表3 48孔板形式

		1	2	3	4	5	6	7	8
		样品1	样品2样品3样品4			样品5样品6		样品7	样品8
		B 样品1	样品2样品3样品4			样品5样品6		样品7	样品8
		C样品1	样品2样品3样品4			样品5样品6		样品7	样品8
		D 控制 20 pM	控制 16 pM	控制 8pM	控制 6 pM	控制 4 pM	控制 2 pM	控制 1 pM	NTC
		E 控制 20 pM	控制 16 pM	控制 8pM	控制 6 pM	控制 4 pM	控制 2 pM	控制 1 pM	NTC
		F 控制 20 pM	控制 16 pM	控制 8pM	控制 6 pM	控制 4 pM	控制 2 pM	控制 1 pM	NTC

D-F行中的威尔斯孔含有对照模板稀释液和无模板对照（NTC），一式三份。A-C行中的威尔斯孔含有一式三份的样品稀释液。



NOTE
Eco软件提供稀释模板和默认循环条件。

- 3 使用Eco密封胶密封平板，注意避免交叉污染，并避免弄脏盖子表面。
- 4 将48孔板置于板适配器上，并将板离心至250 xg，
1 一下

通过qPCR定量

该过程通过qPCR定量文库。

程序

- 1 将48孔板以正确方向放置在qPCR仪上，然后盖上盖子。
- 2 通过从模板选项卡中选择SBS Library Quantification.ecot模板，使用Eco软件中提供的热配置文件。热配置文件如下所示，可在设置中查看|“热剖面”选项卡：

	程序	温度	Time
	热启动	95° C	10分钟
X 40 {		95° C	10秒
		60° C	30秒

- 3 查看安装|“板布局”选项卡，以验证布局是否与模板匹配。
- 4 选择开始运行。

分析库

qPCR过程中的最后一步分析定量文库。

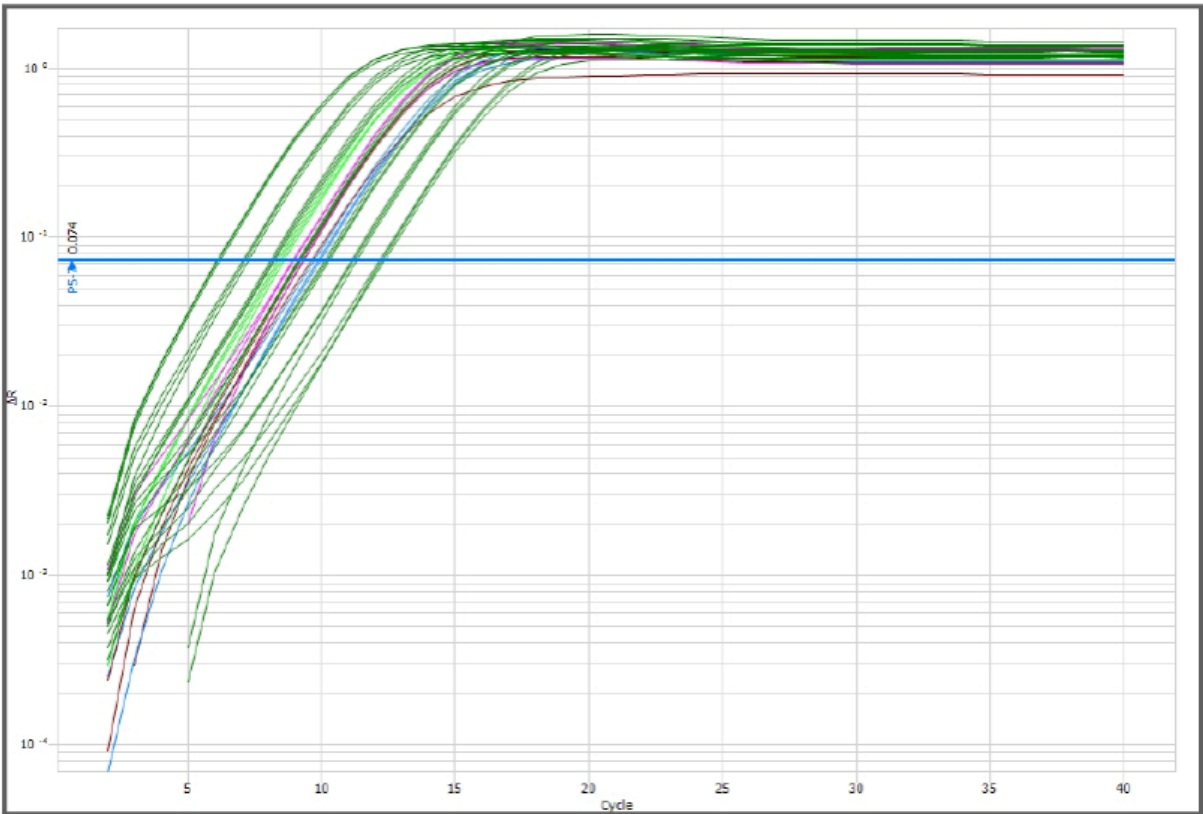
程序

- 1 检查NTC威尔斯孔是否有任何扩增。不应该有任何放大。
- 2 确保对照模板有良好的扩增，并从重复组中删除> 0.5 C_q的离群值。



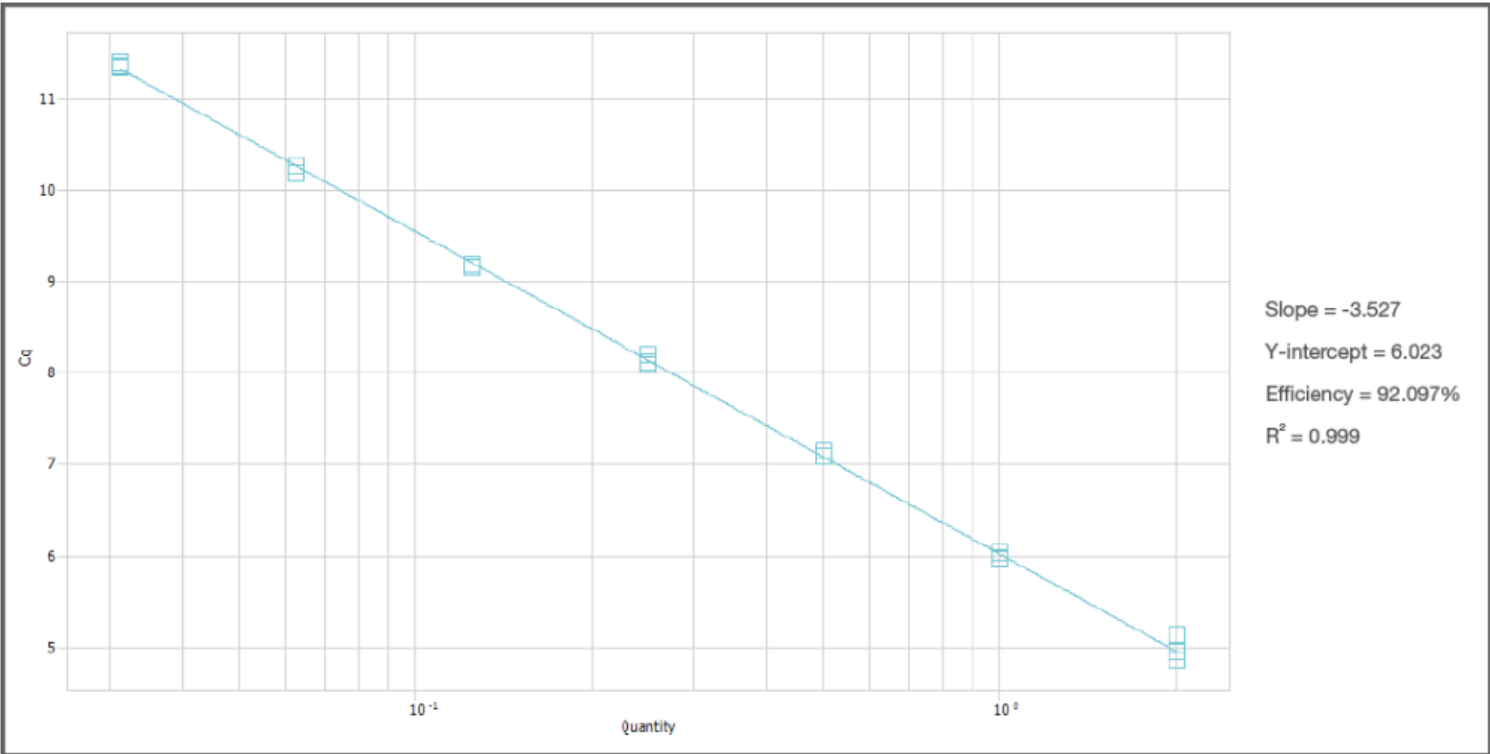
谨慎
每个平板4个或更多离群值表明存在技术错误。

图3 对照模板扩增示例



- 3 通过绘制C_q值与对数初始浓度的曲线，从对照模板生成标准曲线。

图4标准曲线示例



- 4 确保对照模板的扩增效率为90-110%（斜率为-3.6至-3.1）且R>0.99。如果不是，重新评估用于计算标准曲线的数据点。
- 5 根据标准曲线锁定阈值荧光。
- 6 确保未知文库模板有良好的扩增，并从重复组中去除> 0.5 Cq的离群值。



谨慎
每个平板4个或更多离群值表明存在技术错误。

- 7 根据对照模板稀释液生成的标准曲线计算未知文库模板的初始浓度。



NOTE
记住要考虑未知样品的5000倍稀释。

- 8 将定量文库稀释至标准浓度用于聚类。第20页附录B-制备DNA模板中给出了制备用于簇生成的样本DNA的建议方案。

附录A –群集计数

可以通过制备连续稀释液来生成滴定流通池。进行五个测序循环，以获得准确的RTA簇计数。由于RTA中存在改进的算法，第一个周期报告的聚类计数不准确。对照模板的簇滴定应该是线性的，直到簇变得太密集而不能准确计数的点。库滴定的示例如下所示。

用户提供的耗材

- 、 控件库
- 、 测序试剂（足以进行所需的循环次数）
- 、 单读或双端群集生成套件

程序

- 1 制备对照文库的8个系列稀释液，并在流动池上聚集。

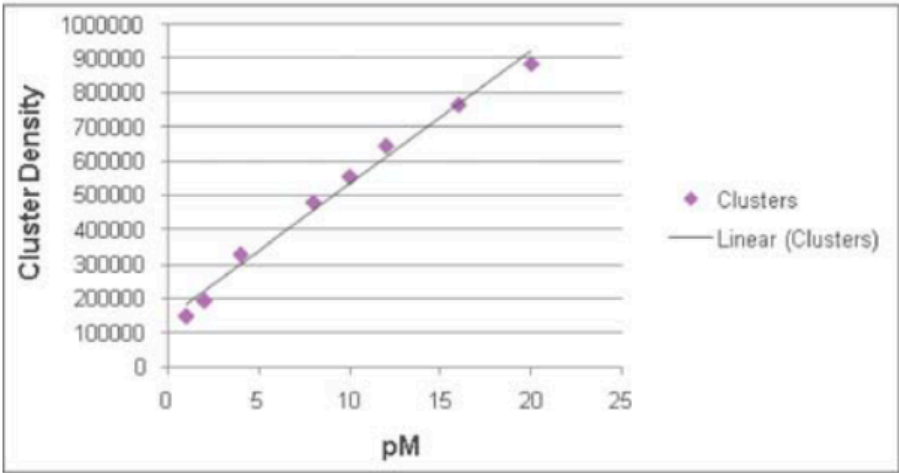


NOTE

通过qPCR定量的文库所需簇的数量应在滴定流通池的范围内。

- 2 进行6个测序循环，对滴定流通池上的簇进行计数。确保有足够的试剂用于运行，每个循环至少有以下试剂。
这些可以是剩余的试剂。
- 3 从摘要文件中获取群集计数。
- 4 将总结表中显示的聚类编号与对照模板的初始浓度作图。
- 5 使用直线方程计算所需簇数所需的pM浓度。

图5文库滴定示例



在上图中，E.将模板大小为300 bp的大肠杆菌对照文库在20 pM、16 pM、8 pM、6 pM、4 pM、2 pM和1 pM的四个流动池上聚类，并在六个测序循环后通过RTA对聚类进行计数。

附录B –制备DNA模板

本节介绍如何准备用于聚类生成的DNA模板。

制备DNA模板涉及两个步骤：

- 、 用2 N NaOH变性
- 、 将DNA稀释到杂交缓冲液中。

用户提供的耗材

- 、 2 N NaOH
- 、 杂交缓冲液
- 、 Tris - Cl 10 mM, pH 8.5
- 、 0.2 ml八管条

变性DNA模板

使用以下说明，用2 N NaOH使模板DNA变性至1 nM的最终DNA浓度。这适合于在高达8pM的DNA浓度下进行杂交步骤。

如果您需要更高的DNA浓度，请参阅第21页的高浓度DNA变性以获得建议的调整。



谨慎

稀释样品中过量的NaOH浓度（大于800 μM）会抑制簇的形成，如果向1 ml杂交缓冲液中加入超过8 μl的NaOH变性DNA样品，就会产生这种效应。

- 1 将联合收割机模板DNA、Tris - Cl（pH 8.5）和2 N NaOH合并至以下体积：
 - 10 nM模板DNA（2 μl）
 - Tris - Cl 10 mM, pH 8.5（17 μl）
 - 2 N NaOH（1 μl）总体积应为20 μl（模板最终浓度为1 nM）。
- 2 短暂涡旋以混合模板溶液。
- 3 脉冲离心溶液。
- 4 在室温下孵育5分钟，使模板变性为单链。

5 将变性的DNA模板置于冰上，直至准备进行最终稀释。

高浓度DNA的变性

仅当需要高于8 pM的DNA浓度时，才使用下表;否则，请遵循第20页的变性DNA模板方案。

表4针对高最终DNA浓度的方案调整

1 ml中所需的最终DNA浓度	模板DNA (10 nM)	Tris-Cl 10 mM, pH 8.5	2 N NaOH	浓度 变性 模板DNA
8-12 pM	3 µl	16 µl	1 µl	1.5 nM
12-16 pM	4 µl	15 µl	1 µl	2.0 nM
16-20 pM	5 µl	14 µl	1 µl	2.5 nM
20-24 pM	6 µl	13 µl	1 µl	3.0 nM

稀释变性DNA

按照以下说明，用预冷xxxHT 1稀释变性DNA至总体积为1, 000 µl。Illumina建议您对DNA模板进行滴定，以确定良好的簇密度。

- 1 将杂交缓冲液从-15 ° C至-25 ° C的储存环境中取出，并在2° C至8° C下解冻过夜或在装有室温去离子水的烧杯中解冻。
- 2 为了达到杂交步骤所需的最终浓度，按如下所述稀释变性DNA：

需最终浓度	5 pM	6 pM	7 pM	8 pM
1 nM变性DNA	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl
预冷HT 1	995 µl	994 µl	993 µl	992 µl

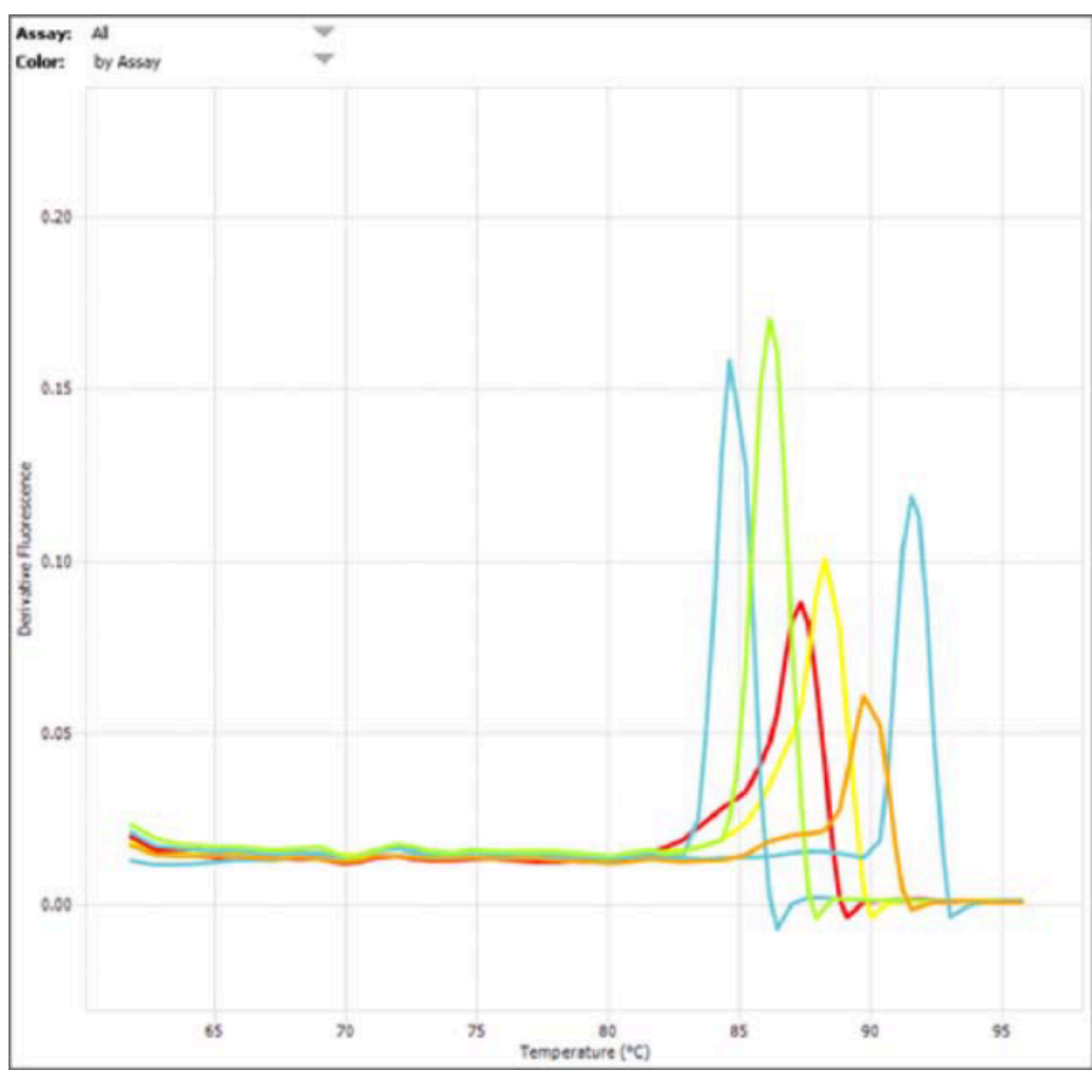
- 3 倒置数次以混合模板溶液。

- 4 脉冲离心溶液。
- 5 标记8管条带1-8的管。
- 6 将120 μ l质控品库分装至8管试剂条的第4管中。这将泳道4中的对照样品置于流动池上。
- 7 将120 μ l稀释的变性样本DNA模板加入8管试剂条的剩余试管中。仔细注意哪个模板进入哪个管。
- 8 在实验室跟踪表上记录每个样品位置和浓度。
- 9 放在冰上，直到准备好将其加载到仪器上。

附录C –文库GC内容

文库的GC含量并不总是已知的，但是可以通过在qPCR仪器上执行解离曲线来估计Illumina文库相对于相同大小的其他Illumina文库的GC含量。文库的GC含量越高，解链温度越高。因此，可以直接比较相同模板长度的文库，并相对于已知GC含量的文库估计未知文库的GC含量。

图6为300 bp Illumina文库生成的解离曲线示例



耗材和器械

- 、 48孔板
- 、 带外摆转子的台式离心机
- 、 环保密封胶
- 、 Eco真实的实时PCR系统
- 、 已知GC含量的Illumina文库（约10 nM）

- 、 未知GC含量的Illumina文库（约10 nM）
- 、 KAPA SYBR FAST MASTER MIX UNIVERSAL 2x特别版

程序

- 1 在48孔板/反应中为每个文库（包括质控品）制备以下反应混合物。

消耗品	μl/孔
KAPA SYBR FAST MASTER MIX UNIVERSAL (2x)	10其它
qPCR引物1.1 (10 μM)	0.2
qPCR引物2.1 (10 μM)	0.2
水	7.6
Illumina文库 (约10 nM)	2
总体积	20

- 2 将光学条盖放在威尔斯孔上，并将48孔板短暂离心至250 xg 1分钟。
- 3 将48孔板以正确方向放置在qPCR仪上，然后盖上盖子。
- 4 使用以下热配置文件：

	程序	温度	时间
X 10 {	热启动	95° C	3分钟
		95° C	3秒
		60° C	30秒

- 5 在热曲线结束时，从60° C缓慢斜升至95° C以产生解离曲线。

注意到

注意到

技术援助

如需技术帮助，请联系Illumina客户支持。

表5 Illumina一般联系信息

Illumina网站	http://www.illumina.com
电子邮件	techsupport@illumina.com

表6 Illumina客户支持电话号码

区域	联系电话
北美免费电话	1.800.809. ILMN (1.800.809.4566)
英国免费电话	0800.917.0041
德国免费	0800.180.8994
荷兰免费电话	0800.0223859
法国免费电话	0800.911850
欧洲其他时区	+44.1799.534000
其他地区 and 地点	1.858.202. ILMN (1.858.202.4566)

Illumina公司

9885 Towne Centre Drive San Diego, CA 92121-1975 +1.800.809.ILMN
(4566) +1.858.202.4566 (北美以外地区) techsupport@illumina.com
www.illumina.com