



北京启衡星生物科技有限公司  
BEIJING FOREVERSTAR BIOTECH CO.,LTD.

## StarLighter Library Quantification Kit (Illumina®) StarLighter文库定量试剂盒 (Illumina®)

货号	产品名称	组分名称	规格
FS-N2002	StarLighter Library Quantification Kit (Illumina®)	StarLighter Library Quantification Standards 1-6 (Illumina®)	80 μL×6
		10× StarLighter Primer Mix (Illumina®)	1 mL
		2× StarLighter SYBR Green qPCR Mix	5 mL
		50× StarLighter Rox High	200 μL
		50× StarLighter Rox Low	200 μL
FS-N20R1	StarLighter Library Quantification Standards 1-6 (Illumina®)	StarLighter LQ Standard 1 20 pM	80 μL
		StarLighter LQ Standard 2 2 pM	80 μL
		StarLighter LQ Standard 3 0.2 pM	80 μL
		StarLighter LQ Standard 4 0.02 pM	80 μL
		StarLighter LQ Standard 5 0.002 pM	80 μL
		StarLighter LQ Standard 6 0.0002 pM	80 μL

### Quick Note

- 本试剂盒中提供的为10倍稀释系列DNA标准品（20 pM 至 0.0002 pM）；
- 确保所建文库与qPCR定量引物兼容；
- 根据qPCR仪器选择合适的产品；
- 准确的液体上样量对于结果的可靠性和可重复性至关重要；
- 该说明书对影响文库准确定量的各种因素进行了深入论述。

## 1 产品描述

文库精确定量对于二代测序的结果是非常重要的。过低估计文库浓度，会导致簇生成过多，数据质量差；过高估计文库浓度，则导致数据产出量少，基因组覆盖率低。所以低估或者高估文库浓度都会影响测序效果。qPCR是DNA文库定量的标准，也是唯一一种能够准确检测出分子数目的方法。



StarLighter Library Quantification Kit (Illumina®) 试剂盒提供基于染料法qPCR的Illumina®文库定量所必须的试剂。试剂盒包括:

- StarLighter Library Quantification Standards 1 – 6 (10倍线性梯度稀释, 模板长度452 bp)
- 10× StarLighter Primer Mix, 具体包含下面两条引物:  
引物1: 5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA-3'  
引物2: 5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA-3'
- 2× StarLighter SYBR Green qPCR Mix (适用于文库定量)

文库定量是利用qPCR定量试剂、定量引物, 通过qPCR方法操作6个10倍稀释的DNA标准品和稀释后的文库样品, 根据6个确定浓度的DNA标准品生成标准曲线, 然后用绝对定量法通过标准曲线计算得到稀释后的文库样本浓度。

该文库定量试剂盒已经过严格测试, 以确保最小的误差。该试剂盒包含了新型耐受SYBR Green染料的快速DNA合成酶。该工程聚有较高的扩增效率, 且能够均衡扩增不同的DNA片段, 可对平均长度长达1kb的Illumina®文库进行可靠的定量分析, 并且对文库类型和GC含量没有限制。

## 2 产品应用

StarLighter Library Quantification Kit (Illumina®) 文库定量试剂盒是专为Illumina®测序前的文库准备设计的精确和可重复的定量试剂盒。本试剂盒适用于任何浓度>0.0002pM, 并且包含和引物互补序列的文库, 而文库的类型、文库构建方式, 或者何种Illumina®测序仪器都无需考虑。该试剂盒支持不同GC含量和平均片段长度高达1kb的文库量化。除了NGS文库定量, 该试剂盒也可用于检测Illumina®文库的制备过程中工作空间的文库污染。该文库定量测定包含重复移液的步骤, 可以进行自动操作。

## 3 产品的兼容性

StarLighter Library Quantification Kit (Illumina®) 文库定量试剂盒适用于任何包含P5、P7序列的NGS文库的量化(准备进行Illumina®测序)。用部分或茎环Adapter制备的文库只能在扩增后使用此试剂盒进行定量。需确保文库准备过程中使用的Adapter序列和产品描述中的文库定量所用引物序列兼容。按照qPCR仪器对参考染料Rox的要求, 选择使用合适的Rox。

## 4 产品规格

### 4.1 运输和储存

该文库定量试剂盒可根据目的地国家、地区使用干冰或冰袋运输。接收后, 立即将整个试剂盒存放在-15°C至-20°C恒温冰箱。正确储存条件下, 试剂盒所有成分能够在标签显示效期内保持全部性能。

### 4.2 处理

确保所有成分在使用之前都解冻并漩涡震荡混匀。SYBR Green染料(包含在定量试剂中)、Rox染料都对光敏感, 长时间暴露在直射光下会导致荧光信号强度下降。



该文库定量试剂盒的所有组分，可以稳定通过30次循环冻融。确保所有试剂在不使用的情况下是-20°C避光储存。当避光储存时，试剂可以在2°C-8°C稳定存贮至少一周，短期使用可存储在该温度下，但要确保不被微生物或者核酸酶污染。

### 4.3 质量控制

试剂盒所有组件都经过严格的功能性质量控制，不存在可检测的杂质和核酸内切酶活性，并对DNA污染有严格要求。

## 5 重要参数

该试剂盒为准备Illumina®测序的文库提供准确和可重复的定量结果。

### 5.1 样品浓度和稀释

待定量文库要稀释到检测的动态范围，即20 pM-0.0002 pM或5.5 pg / $\mu$ l-0.000055 pg / $\mu$ l或 $12 \times 10^6$ - $12 \times 10^1$  个dsDNA分子/ $\mu$ l。任何浓度大于标准品 1的文库，不应使用该试剂盒做文库浓度计算，必须对其进行适当稀释，如果稀释后浓度属于检测的动态范围，则可以用来文库定量。所以，当待测文库的浓度较高时，为保证最佳定量结果，最好将文库稀释到标准品 1至标准品 3之间。

文库稀释倍数应根据同类型库的经验进行估计或换算，或采用其他类似的工作流程，或参考其他方法获得的文库建设过程中的质量控制信息（例如使用Qubit®或 Bioanalyzer、Nanodrop）。

当测试多个文库时，若某些文库浓度（如Qubit浓度）差异不大，为减少计算量或为操作简便，可采用相同的稀释倍数。

### 5.2 样品质量

由于稀释的DNA会在无缓冲环境下降解，待测文库或实验对照品必须用缓冲溶液存储和稀释，如10mM Tris-HCl, pH值8（25°C），可在稀释缓冲液中添加0.05%的Tween®20来提高移液的准确性和减少DNA吸附。不要用水直接稀释待测文库或实验对照品。

每次检测时要准备最新稀释的样品，并在进行qPCR操作时保持在冰上。样品在室温下存放或者放置长时间（如超过3小时，即使在4°C）会导致后面计算文库的浓度值不准确，则必须重新测定，并重新准备稀释样品。

### 5.3 准确的液体处理

由于qPCR是非常灵敏的技术，并且该类测定所测模板均含较低的拷贝数，所以结果的可靠性高度依赖于准确的移液操作，在执行该操作时必须注意确保最高的精确度。注意以下步骤：

- 始终在使用前确保试剂和样品完全解冻和彻底混合。解冻和混合后，短暂离心以去除管壁上的液滴。
- 高浓度的DNA溶液可能粘性较大，因此很难进行小体积移取。要避免在样品制备过程中一次性做出倍数非常大的稀释操作（如大于100倍）。如样品确需稀释倍数较大，才能达到检测的范围，要进行多次梯度稀释。（例如若需进行10000倍稀释，要连续进行两次100倍稀释，而不是一次性10000倍稀释）。



- 尽可能避免使用多通道移液器。
- 每一次移取液体都要使用新的吸头。
- 避免将吸头针尖在抽吸过程置于试剂表面下面太远（如超过1cm），这可能导致液体粘在吸头管身。
- 抽吸任何液体，在添加前要检查吸头末端，以确保正确移取。
- 加样时，总是尽可能将吸头深入到管子的底部，尽量避免反应成分的泄漏。
- 加样后冲洗吸头，吹打2-3次。
- 分配试剂后确保在吸头内没有液体残留。

#### 5.4 污染和无模板对照

始终遵守良好的实验室规范，以避免工作区域的试剂、消耗品和设备受到文库、标准品或扩增子的污染。强烈建议在每个测定中都做无模板对照（no-template controls, NTC），用以检测在反应设置期间引入的污染。NTC的Cq/Ct值应该至少比标准品6的Cq/Ct值多3个循环。

操作过程中，确保从最低浓度到最高浓度（即从标准品6到标准品1）添加DNA标准品，并为每个标准品的每个重复使用新的枪头。可以根据NTC反应的熔解曲线分析确认是何种扩增或污染。

引物二聚体的形成并不少见，因为最初引物的设计并不是针对qPCR设计的，而是根据Illumina®流动槽锚定序列设计的。所用的循环时间也比典型qPCR所用的时间长得多，进一步增加了引物二聚体形成的机会。只要NTC扩增在标准品6之后至少3个循环，引物二聚体的形成就不会影响试剂盒的性能。

#### 5.5 反应体积

尽管该说明书规定了20 μL反应体系，但如果需要，可将体积缩小至10 μL。为了提高准确度，标准品/文库稀释液的体积应保持在4 μL，含Primer Mix的SYBR Green qPCR Mix为6 μL，并确保消耗品、移液器、qPCR反应板、反应体积与qPCR仪器兼容。

#### 5.6 内部控制

将浓缩的DNA文库稀释至该测定的动态范围内，如果文库非常浓且需要大量初始稀释时，这时精确定量有很大的风险。如果每个文库都有多个稀释度并都被测定（并落在标准曲线的动态范围内），连续稀释的 $\Delta Cq/Ct$ 值就可以很好地反映文库浓度并具有可靠性。出于这个原因，建议在每次测定中至少包括一个适当的内部对照控制。这些措施包括：

- Illumina®文库，已用文库定量试剂盒定量，并成功测序。
- PhiX，由Illumina®提供的对照文库。

为了更有效，内部对照应以与待检测文库相同的方式进行了处理，可以用内部对照的多个稀释度设置重复反应。

最好的方法是从最近准备的文库中选择一个或多个（浓度最好大于10 nM）作为内部质控，这些文库已经存储在-20°C的缓冲溶液中（如含0.05% Tween-20的10 mM Tris、Illumina®测序前文库稀释液等），并且没有经过太多的冻融循环。可将其分装成单次的使用量，并保存在-20°C作为对照。



## 5.7 重复数据、数据可靠性，通量和每个样本成本

QPCR 是一种极其敏感的测量技术，易受多种来源的变化影响。标准品，文库样本和对照推荐使用三个平行。

为了提高通量和降低每个样品的成本，重复次数可以减少到两次。在选择工作流程和通量要求的最佳策略时，请记住，数据的可靠性与重复次数成反比。如果没有获得可靠的数据，减少重复次数会增加不得不重新检测的风险。

每个文库至少两个连续稀释被测定，只要这两个稀释度落在测定的动态范围内，通过以这样的方式设计工作流程可以降低重复 qPCR 的风险。

对于高通量的文库构建流水线，强烈建议以 384 孔进行文库定量，同时通过执行 10  $\mu$ L 体系的 qPCR 来降低每个样本的成本。

## 5.8 自动化

使用该试剂盒进行的文库定量适用于自动化，强烈建议使用自动化液体处理平台用于高通量文库定量工作流程。

# 6 操作方法

## 6.1 试剂准备

6.1.1 准备适当体积的 DNA 稀释缓冲液[10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5 (25°C) 含 0.05% Tween<sup>®</sup>-20]。该缓冲液可以在室温或 4°C 下储存，并重复使用。使用前，请始终将缓冲液平衡至室温。

6.1.2 确保试剂盒的所有组件都完全解冻并彻底混合，短暂离心。

6.1.3 记录所有试剂的批号、开启时间，所有组分在 30 次冻融循环中保持稳定，在不使用时应储存在 -20°C 避光条件下，也可在 2°C-8°C 的黑暗中短期保存 2 周，要防止被微生物或核酸酶污染。

## 6.2 样品制备

6.2.1 准备适当的文库稀释液（使用 DNA 稀释缓冲液），根据预估的文库浓度（可参考 Qubit 浓度换算，见启衡星相关产品），适当稀释 1:1000- 1:100000 倍。注意：建议每个文库有 2 个稀释度，以确保至少有一个稀释度落在可检测范围内。

6.2.2 准备内部对照文库。

## 6.3 反应设置

6.3.1 根据样品数、重复数计算所需反应总数：

- 6 个 DNA 标准品
- 待检测的每个文库的每个稀释度
- 任何内部对照文库的每个稀释度
- 无模板对照（NTC）

6.3.2 使用以下反应设置



反应设置: 20  $\mu\text{L}$  体系

For StarLighter Library Quantification Kit (Illumina <sup>®</sup> )	Rox	No Rox
2 $\times$ StarLighter SYBR Green qPCR Mix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
10 $\times$ StarLighter Primer Primix (Illumina <sup>®</sup> )	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
50 $\times$ StarLighter Rox High or Low (根据机型选择)	0.4 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$
PCR-grade water	3.6 $\mu\text{L}$	4.0 $\mu\text{L}$
Total	16.0 $\mu\text{L}$	16.0 $\mu\text{L}$

反应设置: 10  $\mu\text{L}$  体系

For StarLighter Library Quantification Kit (Illumina <sup>®</sup> )	Rox	No Rox
2 $\times$ StarLighter SYBR Green qPCR Mix	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
10 $\times$ StarLighter Primer Primix (Illumina <sup>®</sup> )	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
50 $\times$ StarLighter Rox High or Low (根据机型选择)	0.2 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$
Total	6.2 $\mu\text{L}$	6.0 $\mu\text{L}$

6.3.3 混合并短暂离心试剂混合物。

6.3.4 将适量的混合物分装到每个 PCR 管或孔中。

6.3.5 向所有 NTC 管/孔中加入 4  $\mu\text{L}$  PCR 级水。

6.3.6 将每种标准品 4  $\mu\text{L}$  分配到适当的管/孔中，从最低浓度（标准品 6）到最高浓度（标准品 1）依次加样。

6.3.7 分配 4  $\mu\text{L}$  文库和内部对照的每个稀释度。

6.3.8 盖上管盖或密封 PCR 板，然后转移到 qPCR 仪器上。

6.3.9 使用以下循环 protocol 进行 qPCR，在仪器软件中选择 Absolute Quantification 选项。根据需要调整运行参数（例如 Reporters，参考染料，增益设置等）。

步骤	温度	时间	循环
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	35
退火/延伸/数据采集	60 $^{\circ}\text{C}$	45 sec <sup>1</sup>	
熔解曲线分析 <sup>2</sup>	65-95 $^{\circ}\text{C}$		

<sup>1</sup>长片段文库 (> 700bp) 需要增加到 90 秒。

<sup>2</sup>可选，有关更多详细信息，请参阅数据分析和解释部分。



表格 1 StarLighter SYBR Green qPCR Mix 推荐 Rox 使用类型

仪器	Rox
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, and StepOnePlus™	Rox High
Applied Biosystems® 7500, ViiA™7, QuantStudio™ 12K Flex, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™, and Mx4000™	Rox Low
Rotor-Gene™, DNA Engine Opticon™, Opticon™ 2, Chromo 4™ Real-Time Detector, Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Roche LightCycler® Nano, Bio-Rad CFX96, and Illumina® Eco™	No Rox

## 6.4 数据分析

6.4.1 标注如下表的标准品。请注意，指定的值对应于 DNA 标准品的浓度，而不是每个反应中的最终 DNA 浓度。不需要将它们转换为实际值，只要在所有反应中使用相同体积的模板（稀释的文库或内部对照）即可。

StarLighter LQ Standard 1	20 pM
StarLighter LQ Standard 2	2 pM
StarLighter LQ Standard 3	0.2 pM
StarLighter LQ Standard 4	0.02 pM
StarLighter LQ Standard 5	0.002 pM
StarLighter LQ Standard 6	0.0002 pM

6.4.2 回顾减去背景的（标准化的）扩增曲线和重复数据点（DNA 标准品、文库和对照）的 Cq/Ct 值，并排除明显的异常值，保证重复数据点差值 ≤ 0.2 个循环。如果数据集包含许多异常值，则结果不可靠。重复测定，要特别注重提高移液精度。

6.4.3 排除所有超出分析动态范围的文库稀释度，即平均 Cq/Ct 值低于标准品 6 或高于标准品 1 的文库。如果文库的所有稀释度均超出标准曲线范围，需重新计算更适当的文库稀释度。

6.4.4 使用仪器软件生成标准曲线。标准曲线也可由分析模板手动生成。

6.4.5 检查标准曲线以确保符合以下标准：

- 计算的反应效率在 90-110% 的范围内（即 PCR 产物每个循环增加 1.8-2.2 倍，标准曲线的斜率在 -3.1 和 -3.6 之间）。
- $R^2 \geq 0.99$ 。

如果标准曲线不符合这些标准，则计算的文库浓度将不可靠，需重新测定。

6.4.6 大多数 qPCR 软件将根据标准曲线使用绝对定量计算文库浓度和内部对照浓度。可将 qPCR 数据导出，以进行批量计算。

- 数据导出后，使用标准曲线将每个文库和内部对照的每种稀释度的平均 Cq 值换算成平均浓度（单位为 pM）。
- 将计算的平均浓度乘以以下因子，计算每个文库和对照的每种稀释度的平均浓度大小（单位为 pM）：

标准品大小（452 bp）/ 文库的平均片段长度（bp）

- 将每个文库或对照的每种稀释度的平均大小，乘以适当的稀释倍数，以计算未稀释的文库或内部对照的每种文库的最终浓度。



4.6.7 检查最终计算得到的浓度值并确定用于下游处理的每个样品的工作浓度（如用于目标富集或簇生成）。

## 7 问题与分析

问题	可能的原因
效率不在特定范围内（90 - 110%）	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 标准品 6 与标准品 5 相比 &lt;math&gt;&lt;3.1&lt;/math&gt; 个循环，且 NTC 小于标准品 6 之后的 3 个循环；效率超过 100% 可能表示污染。检查溶解曲线以确定污染源（标准品 DNA 或文库 DNA）。</li> <li>● 基线设置可能会延迟标准品 1 的 <math>C_q/C_t</math> 值，影响效率。手动调整基准。</li> <li>● 不良的液体处理。</li> </ul>
$R^2$ 值 <math><0.99</math>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 不良的液体处理，确保所有试剂在使用前彻底混合。</li> <li>● 与仪器或试剂保存有关。</li> </ul>
标准品间隔不正确（不在 3.1 - 3.6 个循环）	<ul style="list-style-type: none"> <li>● DNA 标准品 5 和 6 之间的 <math>\Delta C_q/C_t &lt; 3.1</math> 表示污染。检查融解曲线以确定污染物是标准 DNA 还是文库 DNA。</li> <li>● DNA 标准品 1 和 2 之间的 <math>\Delta C_q/C_t &lt; 3.1</math> 可能指示背景扣除的问题。手动调整基准。</li> <li>● <math>\Delta C_q/C_t &gt; 3.6</math>，反应效率差。确保所有试剂在使用前彻底混合。确认所有反应组分均以正确的浓度添加，并且使用正确的循环方案。</li> <li>● 试剂严重曝光会降低总荧光，并可能导致 <math>C_q/C_t</math> 值延迟，导致 <math>\Delta C_q/C_t</math> 值 &gt; 3.6。</li> </ul>
平行对照之间重复性差	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 不良的液体处理，确保所有试剂在使用前彻底混合。</li> <li>● 仪器相关问题，确保使用正确的参比染料，浓度正确。</li> </ul>
文库稀释度的 $\Delta C_q$ 不在预期范围内（2 倍稀释为 0.9-1.1）	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 准备文库稀释液时处理不当。</li> <li>● 文库扩增有挑战性，即可能富含 GC 或 AT，或具有过长的平均扩增长度 (&gt; 1 kb)。</li> <li>● 文库 DNA 已降解，准备新鲜稀释液并在反应过程中保持在冰上。</li> </ul>
从不同文库稀释度计算的浓度相差超过 10%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 准备文库稀释液时处理不当。</li> <li>● 文库对扩增有挑战性，即非常富含 GC 或 AT，或具有过长的平均扩增长度 (&gt; 1 kb)。</li> <li>● 文库 DNA 已降解。准备新鲜稀释液并在反应过程中保持在冰上。</li> </ul>
文库稀释度不在标准曲线的动态范围内	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 不应使用在 DNA 标准品 1 之前扩增的稀释液。只使用那些在标准曲线范围内的稀释液。如果没有，用更合适的稀释倍数重新测定。</li> <li>● 标准 6 后扩增的文库不可能含有大量的文库 DNA，重复测定以确认结果。</li> </ul>
标准品 1 扩增曲线出现异常	仪器正在去除早期背景，调整基线设置。



标准品正常扩增，  
但待测文库没有，  
或文库扩增延迟

- 文库不包含定量引物结合的合适接头序列。
- 初始稀释时的误差，或文库 DNA 降解，重新测定新稀释的文库。



启明东方 衡久未来

---

## 北京启衡星生物科技有限公司

地址：北京市昌平区生命园西环路21号楼南楼三层

网址：[www.qihengxing.com](http://www.qihengxing.com)

电话：010-62149251

邮箱：[sales@qihengxing.com](mailto:sales@qihengxing.com) [marketing@qihengxing.com](mailto:marketing@qihengxing.com)  
[support@qihengxing.com](mailto:support@qihengxing.com)



扫码关注  
了解更多产品信息

本产品仅供研究，不做为临床诊断使用

版本号：V1