



# NGS illumina 平台杂交捕获试剂盒(含磁珠)

## 使用说明书

货 号:

**NGS24031-S(24 rxns)**

**NGS24031-L(96 rxns)**



## 一、试剂盒简介

NGS illumina 平台杂交捕获试剂盒(含磁珠)是适用于 illumina 高通量测序平台的杂交捕获试剂盒，其中包括杂交缓冲液试剂、洗脱缓冲液试剂、人基因组重复序列封闭试剂、文库接头封闭试剂、捕获磁珠、PCR 扩增试剂和 PCR 扩增引物。该试剂盒具有良好的灵敏性和特异性，可以广泛应用于复杂疾病相关致病基因的研究以及健康筛查等众多领域。试剂盒提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

## 二、试剂盒规格及组分

	组分名称	NGS24031-S (24 rxns)	NGS24031-L (96 rxns)	保存温度
Box 1	2×磁珠清洗缓冲液	1.28 mL×3	15.36 mL	-25~-15 °C
	2×杂交缓冲液	408 μL	1632 μL	-25~-15 °C
	10×高盐缓冲液	768 μL	1536 μL×2	-25~-15 °C
	10×低盐缓冲液	672 μL	1544 μL×2	-25~-15 °C
	10×洗涤缓冲液 A	384 μL	1536 μL	-25~-15 °C
	10×洗涤缓冲液 B	384 μL	1536 μL	-25~-15 °C
	杂交增强剂	132 μL	528 μL	-25~-15 °C
Box 2	Human COT-1 DNA	120 μL	480 μL	-25~-15 °C
	ILM Universal Blockers	48 μL	192 μL	-25~-15 °C
	2×PCR 扩增混合液	600 μL	1.2 mL×2	-25~-15 °C
	10×PCR 引物混合液(ILM)	120 μL	480 μL	-25~-15 °C
Box 3	链霉亲和素磁珠	1.2 mL	4.8 mL	2~8°C
	DNA 分选纯化磁珠	1.44 mL	5.76 mL	2~8°C

注：试剂使用前，尽量保证完全溶解无沉淀，混匀后瞬时离心至管底。10×高盐缓冲液、10×低盐缓冲液在室温溶解后可能会有少许浑浊，此时可以 65℃水浴至澄清后，再稀释至 1×使用。2×杂交缓冲液在使用前如果发现结晶析出，应在 65℃水浴锅中水浴至完全溶解后使用。试剂使用后，应尽快放置于-25℃至-15℃条件下保存。

## 三、保存与运输条件

Box1: -25 ~ -15℃保存，干冰运输。

Box2: -25 ~ -15℃保存，干冰运输。

Box3: 2 ~ 8℃保存，冰袋运输。

## 四、自备材料

无水乙醇、Nuclease-Free Water、Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品等。

真空浓缩仪、磁力架、PCR 仪、微型离心机、涡旋振荡器、Qubit 定量仪或者其他定量仪器、Agilent 2100

Bioanalyzer 或其他片段分析仪、200  $\mu$ L PCR 单管或者八联排管、1.5 mL 离心管等。

## 五、注意事项

### 5.1 样本处理

5.1.1 推荐使用真空浓缩仪对混合后的 DNA 文库进行浓缩，此方法操作简便，而且 DNA 文库损失低，可以获取高质量的文库样本。

5.1.2 浓缩时间可根据液体体积预估，可在实验前测试液体体积与对应浓缩时间的大概经验值，浓缩时间不宜过长，但必须保证文库混合液完全蒸干，否则杂交体系的不准确将影响文库捕获效率。

5.1.3 试剂盒提供的杂交捕获体系可以满足 1-12 杂不同需求，一般情况下，建议文库混杂投入比 $>50\%$ （混杂投入比=单个样本投入杂交捕获的文库量/单个样本文库构建总产量 $\times 100\%$ ）。

5.1.4 对于 Size 分布均一、所需测序数据量相同的文库，推荐在文库混杂投入比 $>50\%$ 的前提下，每个文库均投入 500 ng 混杂，以提高文库丰富度，降低测序数据的重复率。

5.1.5 对于 Size 分布不均一、样本质量差异较大、所需测序数据量不同的文库，建议样本质量比较接近且测序数据量相同的文库进行混杂，有助于不同子文库之间均衡数据的产出。

### 5.2 杂交时间和温度控制

5.2.1 试剂盒提供的杂交捕获体系可适用于 2-16 hr 杂交。但与 16 hr 杂交相比，不同大小的 Panel 随着杂交时长的缩短，在捕获文库产量、捕获效率、覆盖均一性等方面稍微降低。

5.2.2 一般情况下，相比中大型 Panel ( $>0.4$  Mb)，小型 Panel ( $<0.4$  Mb) 在杂交时间缩短时，受到的影响更大。对于有时效性要求的，可对大型 Panel 尝试缩短杂交时间，但不建议将此种情况用于小型 Panel。

5.2.3 杂交捕获洗脱过程中，对温度的控制较为严格，直接影响到实验操作的成功率和测序数据表现，需要特别注意。尤其是在需要  $65^{\circ}\text{C}$  操作时，注意温控仪器的温度偏差不要超过  $0.5^{\circ}\text{C}$ ，主要有以下几点：

- 1) 杂交时体系温度需要保持在  $65^{\circ}\text{C}$ ，应使用 PCR 仪，设置热盖温度为  $100^{\circ}\text{C}$ 。
- 2) 链霉亲和素磁珠捕获时，应保持反应体系在  $65^{\circ}\text{C}$  PCR 仪中，设置热盖温度为  $75^{\circ}\text{C}$ 。每 10-12 min 取出 PCR 管轻轻振荡混匀，防止磁珠沉降。每次取出振荡混匀时要迅速，3-4 sec 即可，使反应体系保持在  $65^{\circ}\text{C}$ ，尽量避免温度降低。
- 3) 热洗脱步骤对温度要求较严格，每次操作尽量保持在  $65^{\circ}\text{C}$ ，避免温度降低。混匀时可以轻轻颠倒混匀，防止气泡产生。
- 4) 实验室内环境温度必须稳定在  $20-25^{\circ}\text{C}$ ，温度过低会影响洗脱实验操作的稳定性。

### 5.3 关于 PCR 循环数

5.3.1 捕获后文库产量与许多因素相关，除去实验操作的影响外，一般会有以下理论影响因素：样本类型、起始混杂文库总量、Panel 大小、杂交时长、扩增循环数等。为获得良好的实验数据，在满足上机测序所需用量的前提下，应尽量控制捕获后扩增循环数。

5.3.2 illumina 平台在上机测序前会对文库进行指数式扩增的成簇反应，故所需的上机文库总量较低。可根据 Panel 大小的不同，在实验初期参考下表中推荐的循环数，后期再根据具体结果进行调整：

表 1 杂交文库扩增推荐循环数

Panel size	1-plex	4-plex	8-plex	12-plex
>100,000 probes	10 cycles	8 cycles	7 cycles	6 cycles
10,000-100,000 probes	12 cycles	10 cycles	9 cycles	8 cycles
500-10,000 probes	13 cycles	11 cycles	10 cycles	10 cycles
1-500 probes	14 cycles	12 cycles	11 cycles	11 cycles

#### 5.4 纯化磁珠和链霉亲和素磁珠

5.3.1 磁珠应保存于 4℃ 条件，使用前请平衡至室温使用。

5.3.2 磁珠使用前，请充分震荡混匀或使用移液器吸吹混匀。

5.3.3 磁珠漂洗使用新鲜配置的 80%乙醇。

5.3.4 转移或弃去上清时，注意不要吸取磁珠，否则将影响文库质量。

5.3.5 产物洗脱前，磁珠应充分干燥，但不可使磁珠干燥开裂，磁珠干燥不充分或者过度干燥都将影响建库效果。

#### 5.5 关于仪器和耗材选择

5.5.1 使用 PCR 仪过夜杂交时，建议提前对杂交体系损耗进行测试：使用 17 μL Nuclease-Free Water 代替杂交体系进行测试，65℃ 反应 12 h，体积损失应小于 0.5 μL，确保 PCR 管及 96 孔板的密封性良好。

5.5.2 捕获实验中所用的实验耗材，如离心管、移液器吸头等，请务必使用低吸附系列，避免样本损失。

#### 5.6 其他注意事项

5.6.1 本试剂盒仅供科研使用，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。

5.6.2 避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。

5.6.3 反应液配置时应尽量避免产生气泡，并注意防止漏液。

5.6.4 PCR 产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，从而影响实验结果的准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；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），以保证实验环境的洁净度。

5.6.5 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。

5.6.6 加样所用的移液器需要定期检测，保证加样的准确性。

## 六、操作步骤

该操作步骤主要包括：将制备好的文库与 Human COT-1 DNA、ILM Universal Blockers 混合封闭，封闭后样本与探针杂交，洗脱缓冲液的准备及链霉亲和素磁珠准备，磁珠捕获及洗脱，杂交后 PCR 扩增。

### 6.1 封闭文库

6.1.1 将 ILM Universal Blockers 与 Human COT-1 DNA 放置室温溶解，旋涡振荡混匀并离心，置于冰上备用。

6.1.2 取一个新的八联排管或者 0.2 mL 离心管，配制表 2 封闭反应体系：

表 2 封闭反应体系

试剂	体积
DNA 文库	X $\mu$ L
Human COT-1 DNA	5 $\mu$ L
ILM Universal Blockers	2 $\mu$ L

6.1.3 涡旋振荡混匀，瞬时离心至管底部。用真空浓缩仪在 60℃ 条件下进行浓缩，至看不见液体为止。

注：浓缩好的混合物可以暂时放置在 4℃ 过夜，或者 -20℃ 保存 1-2 周左右。

### 6.2 封闭后的文库与探针杂交

6.2.1 将 Box1 室温解冻，震荡混匀，各试剂短暂离心后置于冰上备用。

注：2× 杂交缓冲液必须充分融解至完全无结晶。如室温无法融解，可置于 65℃ 水浴中孵育约 10-30 min，期间涡旋混匀，直到结晶完全溶解。

6.2.2 向浓缩后的混合液中加入表 3 中的试剂：

表 3 杂交体系

试剂	体积
2× 杂交缓冲液	8.5 $\mu$ L
杂交增强剂	2.7 $\mu$ L
杂交探针	4 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	1.8 $\mu$ L
Total	17 $\mu$ L

6.2.3 用移液枪吹打数次混匀后，室温孵育 5-10 min。

6.2.4 轻轻旋涡混匀后，短暂离心。

6.2.5 盖紧管盖，立即放入提前预热至 95℃ 的 PCR 仪中(热盖温度 100℃)，运行表 4 程序：

表 4 杂交程序

温度	时间
95℃	30 sec
65℃	4-16 hor
65℃	∞

### 6.3 洗脱缓冲液及链霉亲和素磁珠准备

#### 6.3.1 洗脱缓冲液准备

1) 根据杂交捕获反应个数 N，按照下表配置 1×工作缓冲液，配置好的 1×工作缓冲液可以室温放置保存 1 个月。

表 5 1×工作缓冲液稀释体系

试剂	试剂体积	Nuclease-free Water 体积	1×工作缓冲液体积
2×磁珠清洗缓冲液	N*160 μL	N*160 μL	N*320 μL
10×高盐缓冲液	N*32 μL	N*288 μL	N*320 μL
10×低盐缓冲液	N*28 μL	N*252 μL	N*280 μL
10×洗涤缓冲液 A	N*16 μL	N*144 μL	N*160 μL
10×洗涤缓冲液 B	N*16 μL	N*144 μL	N*160 μL

2) 根据杂交捕获反应个数 N，按照下表体积对稀释后的 1×低盐缓冲液和 1×高盐缓冲液进行预热，至少预热 30 min 后才能使用，并确保管盖盖紧，避免液体蒸发损失。

表 6 1×工作缓冲液稀释预热体系

试剂	试剂体积	温度
1×高盐缓冲液	N*320 μL	65℃
1×低盐缓冲液	N*120 μL	65℃

3) 剩余的 N\*160 μL 1×低盐缓冲液保持在室温，以备常温洗脱。

#### 6.3.2 链霉亲和素磁珠准备

注：链霉亲和素磁珠准备过程中，每次在磁力架上去除上清后，磁珠均不需要晾干，可直接进行下一步。

6.3.2.1 将链霉亲和素磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。

6.3.2.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将链霉亲和素磁珠混匀。

6.3.2.3 对于每个杂交反应，取 50 μL 链霉亲和素磁珠于 0.2 mL PCR 管中。

6.3.2.4 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后(约 1 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.3.2.5 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 100 μL 1×磁珠清洗缓冲液，旋涡振荡 30 s。

6.3.2.6 再次将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后(约 1 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.3.2.7 重复步骤 6.3.2.5 和步骤 6.3.2.6 两次(少量的缓冲液残留不会影响文库与磁珠结合)。

6.3.2.8 在每个杂交反应的磁珠中，加入按照表 7 组分配置的磁珠重悬液：



表 7 磁珠重悬体系

试剂	体积
2× 杂交缓冲液	8.5 $\mu$ L
杂交增强剂	2.7 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	5.8 $\mu$ L
Total	17 $\mu$ L

6.3.2.9 充分旋涡振荡，混匀磁珠，轻轻瞬时离心，即得磁珠混合液。

## 6.4 磁珠捕获及洗脱

### 6.4.1 磁珠捕获

1) 保持步骤 6.2.5 的杂交混合液保持在 PCR 仪 65℃ 孵育步骤，将磁珠混合液（步骤 6.3.2.9 所得产物）加入杂交混合液中，瞬时离心，轻轻涡旋振荡，使磁珠重悬均匀，液体不要溅到管盖上。

2) 将 PCR 管置于 65℃ 预热好的 PCR 仪上，65℃ 孵育 45 min（**热盖 75℃**），期间每 10-12 min 取出 PCR 管轻轻振荡混匀，防止磁珠沉降。

注：混匀时尽量避免液体溅到管盖上。每次取出振荡混匀时要迅速，使反应体系保持在 65℃，尽量避免温度降低。

### 6.4.2 洗脱

#### 6.4.2.1 热洗脱

注 1：热洗脱步骤对温度要求较严格，每次操作尽量保持在 65℃，避免温度降低。

注 2：如果同时操作多个样本，每次加入预热的 1× 低盐缓冲液和 1× 高盐缓冲液时，每个样本间都需要更换枪头，避免 Buffer 量不足。

1) 磁珠捕获步骤结束后，保持 PCR 管在 65℃ PCR 仪上，立即加入 100  $\mu$ L 预热的 1× 低盐缓冲液，颠倒混匀，防止气泡产生。

2) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清。

3) 将 PCR 管从磁力架上取出，放置于 65℃ PCR 仪上，立即加入 150  $\mu$ L 预热的 1× 高盐缓冲液，颠倒混匀，防止气泡产生。

4) 将 PCR 管置于 65℃ 孵育 5 min。

5) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清。

6) 重复步骤 3) - 5) 一次。

#### 6.4.2.2 室温洗脱

注：洗脱步骤中，每次去除上清后，磁珠无需晾干，立即进行下一步。

1) 加入 150  $\mu$ L 室温放置的 1× 低盐缓冲液，轻柔震荡混匀。

2) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 混匀一次。

3) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

4) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 150  $\mu$ L 室温放置的 1× 洗涤缓冲液 A，轻柔震荡混匀。

- 5) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 混匀一次。
- 6) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。
- 7) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 150  $\mu$ L 室温放置的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 B，轻柔震荡混匀。
- 8) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 混匀一次。
- 9) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。
- 10) 加入 20  $\mu$ L Nuclease-Free Water，用移液枪上下吹打数次，将磁珠完全重悬，随后进行 PCR 扩增。

注：本步骤不要丢弃磁珠，需要捕获产物和磁珠一起进行 PCR 扩增。

## 6.5 磁珠捕获后扩增

6.5.1 将 10 $\times$ PCR 引物混合液(ILM)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.5.2 将 2 $\times$ PCR 扩增混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.5.3 将洗脱产物置于冰上，配置表 8 中的体系：

表 8 文库扩增体系

试剂	体积
洗脱产物（6.4.2.2 磁珠洗脱液）	20 $\mu$ L
2 $\times$ PCR 扩增混合液	25 $\mu$ L
10 $\times$ PCR 引物混合液(ILM)	5 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

6.5.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.5.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 9 程序(热盖温度 105 $^{\circ}$ C)：

表 9 文库扩增程序

温度	时间	循环
98 $^{\circ}$ C	2 min	1
98 $^{\circ}$ C	20 sec	X*
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	2 min	1
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	1

\*注：通常 PCR 循环数需要根据杂交情况不同进行调整，具体循环数见第 2 页注意事项 5.3.2。

## 6.6 文库扩增产物纯化

6.7.1 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

6.7.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

6.7.3 向 PCR 产物中加入 60  $\mu$ L(1.2 $\times$ ) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。



6.7.4 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.7.5 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6.7.6 重复步骤 6.7.5。

6.7.7 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10  $\mu$ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

6.7.8 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 21  $\mu$ L Nuclease-Free Water，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

6.7.9 将 PCR 管短暂离心并放置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 20  $\mu$ L 上清至干净的管中，产物保存于-20℃，避免反复冻融。

## 6.8 文库质检

6.8.1 使用 Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品对文库进行定量。

6.8.2 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪对文库进行片段分析。

## 七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。