

QKGEN[®] 普通 DNA 杂交捕获试剂盒
(for Illumina)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

目 录

一、产品简介.....	1
二、产品组分.....	1
三、自备材料.....	1
四、注意事项.....	2
五、操作流程图.....	4
六、操作流程.....	5

一、产品简介

本试剂盒是专为 illumina 测序平台设计开发的靶向捕获流程相关的杂交捕获试剂盒。本产品通过不断优化的杂交体系以及大量的重复验证实验，具有卓越的产品性能。不仅具有更高的均一性和捕获效率，而且高效的杂交效率使得杂交反应更快完成，同时还可以兼容不同品牌设计的 DNA 探针或 panel。本试剂盒所有产品均经过严格的质量把控，保证了产品的性能以及批次间的稳定性。

二、产品组分

名称	货号	组分	规格 (96T)	储存位置
QKGEN [®] Hybridization Reagents	QZJ20096	Hyb BufferA	1632 μ L	box 1 (-20 °C)
		Hyb BufferB	522 μ L	
QKGEN [®] Wash Buffers	QXT20096	2 X Bead Wash buffer	15.36 mL	
		10×Wash Buffer 1	2.688 mL	
		10×Wash Buffer 2	1.536 mL	
		10×Wash Buffer 3	1.536 mL	
		10×Wash Buffer S	3.072 mL	
QKGEN [®] Universal Blockers Kit (for illumina)	QIU10096	ILMN-TS Universal Blockers	192 μ L	
		Human Cot-1 DNA	480 μ L	
QKGEN [®] Post-PCR Kit (for illumina)	QIP00096	Post PCR Primers (ILMN-TS)	480 μ L	
		2x HiFi HotStart Ready Mix	2.4 mL	
QKGEN [®] Binding and Purification Beads	QBP00096	Binding Beads	4.80 mL	box 2 (2-8°C)
		Purification Beads	8.64 mL	

三、自备材料

1. 探针

名称	推荐品牌	描述
探针 Probes 或 Panels	齐凯基因	定制或商品化

2. 其他自备试剂和耗材

名称	描述
无水乙醇	--
无核酸酶水	--
文库定量试剂 Qubit	ThermoFisher 的 Qubit dsDNA HS Assay Kit
文库片段分析试剂 2100	Agilent 的 High Sensitivity DNA Kit
1.5mL 低吸附离心管	--
0.2mL PCR 管	--
96 孔板	--
各规格移液器及其吸头	--

3. 仪器设备

名称	描述
PCR 仪	--
Agilent 2100 或其他类似设备	也可使用 Qseq 100 生物分析仪
磁力架	--
掌上离心机	--
振荡器	--
Qubit 荧光计	Life
垂直翻转混匀仪	--
真空浓缩仪	--
金属浴	--
计时器	--

四、注意事项

1. 关于试剂和仪器

(1) **Binding and Purification Beads** 使用前应先提前半小时从 4°C 冰箱拿出，平衡至室温，充分混匀后使用，否则会导致得率下降。

(2) 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。

(3) 实验之前请熟悉整个操作流程，特别是注意事项，需要预设置真空浓缩仪、PCR 仪和金属浴等温控设备，注意准确设置反应温度和热盖温度。

2. 关于仪器和耗材

(1) 建议提前对杂交损耗进行测试：使用蒸馏水替代杂交体系进行测试，65°C 12 h 损失应 < 0.5 μ L，确保 PCR 管及 96 孔板的密封性。

(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。

3. 关于文库浓缩

(1) 推荐使用真空浓缩法，此方法操作简便，而且 DNA 文库损失低，可获得最佳质量的杂交文库。

(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，避免糊底，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。

4. 关于温度控制

(1) 杂交时体系温度和热盖温度设置，应严格按照说明进行操作。

(2) 杂交捕获过程中应严格控制洗脱温度，Wash Buffer S 每次操作尽量保持在 65°C，避免温度降低。多个样品洗脱时，间隔时间不可过长。

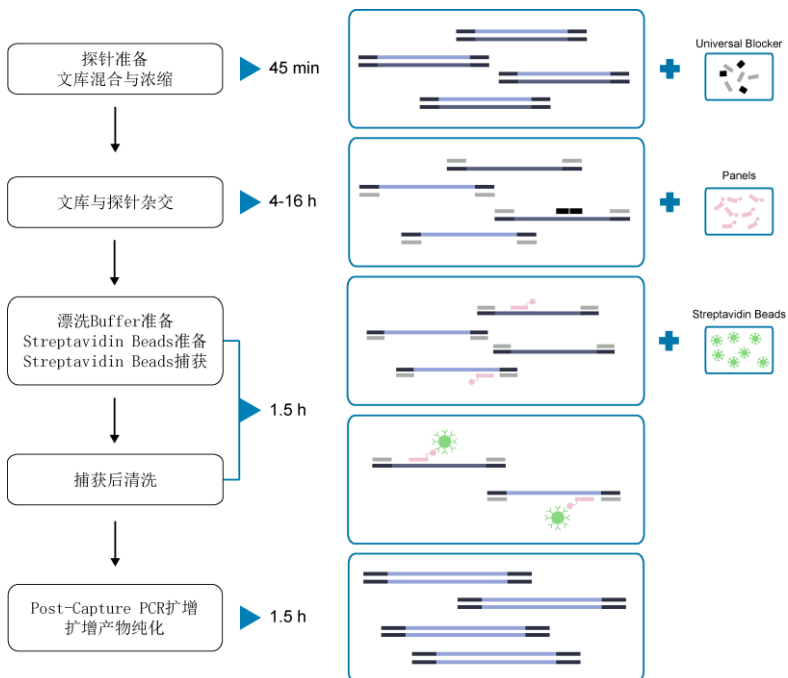
(3) 实验室内环境温度必须稳定在 20–25°C，温度过低影响捕获洗脱实验操作的稳定性。

5. 关于杂交时间的选择

(1) 齐凯基因提供的杂交捕获体系可适用于 4-16 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。

(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。

五、操作流程图



六、操作流程

(一) 预杂交体系制备

1. 文库 pooling。根据实验需要，进行多个样本杂交或单一样本杂交，具体的样本文库 pooling 方案如下表所示（单个 DNA 文库的用量推荐使用 500ng，也可以使用 200ng~500ng 之间的投入量进行大于 12 重的杂交，但文库总量不得大于 6 μg ）：

混合样本数量	每个文库的用量	每个反应文库总量
1	500 ng	500 ng
2	500 ng	1,000 ng
3	500 ng	1,500 ng
4	500 ng	2,000 ng
8	500 ng	4,000 ng
...
12	500ng	6,000 ng

2. 计算出不同样本用量，在离心管中混合均匀。
3. 根据下表配制预杂交体系，混合均匀并瞬时离心：

组分	体积
Human cot-1 DNA	5 μL
ILMN-TS Uuniversal Blockers	2 μL
pooling 文库	500 ng~6 μg

4. 将以上混合好的预杂交体系在真空浓缩仪中常温（如需加热，温度不高于 60 $^{\circ}\text{C}$ ）烘干。

(二) 杂交反应

1. 提前设置好杂交反应程序并预热：

温度	时间
100 $^{\circ}\text{C}$	热盖
95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
65 $^{\circ}\text{C}$	4~16 h
65 $^{\circ}\text{C}$	hold

2. 向已烘干的预杂交体系中加入 8.5 μL Hyb Buffer A、2.7 μL Hyb Buffer B 及 1.8 μL Nuclease Free Water, 用指尖轻弹管底, 室温孵育 5-10min, 使其充分溶解, 轻轻涡旋 3-5sec, 短暂离心, 排除气泡。

3. 向配好的杂交体系加入 4 μL 探针 panel, 轻轻涡旋 3-5sec, 短暂离心, 排除气泡。将杂交体系全部转移到洁净的 PCR 反应管中, 短暂离心, 将 PCR 反应管置于预热好的 PCR 仪上开始杂交反应。

(三) 洗脱

1. 试剂准备:

提前将所有洗涤液从-20°C冰箱取出, 在室温中充分溶解重悬 (10 \times Wash Buffer 1 易出现结晶, 可置于 65°C中加热溶解)。完全溶解后, 开始配置 1 \times 工作液:

1) 将 2 \times Bead Wash buffer 取出稀释到 1 \times , 置于室温备用, 每个反应需要 320 μL 的 1 \times Bead Wash buffer。

2) 将 10 \times Wash Buffer 1 取出稀释到 1 \times , 每反应需要 280 μL 1 \times Wash Buffer 1, 取出 110 μL 置于 65°C金属浴上预热, 剩余的放置在室温中备用。

3) 将 10 \times Wash Buffer 2 取出稀释到 1 \times , 置于室温备用, 每反应需要 160 μL 1 \times Wash Buffer 2。

4) 将 10 \times Wash Buffer 3 取出稀释到 1 \times , 置于室温备用, 每个反应需要 160 μL 1 \times Wash Buffer 3。

5) 将 10 \times Wash Buffer S 取出稀释到 1 \times , 置于 65°C金属浴上预热, 每个反应需要 320 μL 1 \times Wash Buffer S。

6) 配置磁珠结合液:

磁珠结合液组分	μL /反应
Hyb Buffer A	8.5
Hyb Buffer B	2.7
Nuclease Free Water	5.8
total	17

2. 链霉亲和素磁珠准备:

-
- 1) 提前取出 Binding Beads (链霉亲和素磁珠), 室温平衡 30min。
 - 2) 震荡预平衡的链霉亲和素磁珠直至完全混匀, 加入 50 μ L 磁珠至 1.5ml 离心管中。
 - 3) 加入 100 μ L 1 \times Bead Wash buffer 并用枪头吹打混匀。
 - 4) 将离心管置于磁力架上 1min 或至溶液澄清, 弃去上清, 取下离心管;
 - 5) 重复以上洗涤步骤 2 次, 共 3 次;
 - 6) 最后一次清洗后, 加入 17 μ L 磁珠结合液, 轻柔吹吸混匀, 将全部磁珠结合液转移至 1 个新的 0.2mL 低吸附 PCR 管中;
 - 7) 将含有悬浮捕获磁珠的 0.2mL PCR 管放入 PCR 仪中, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

3. 结合与洗脱:

- 1) 杂交反应完成后, 迅速将杂交产物全部转移到已孵育的磁珠结合液中, 轻柔吹打混匀, 避免产生气泡, 重新置于 65 $^{\circ}$ C PCR 仪上 (热盖 70 $^{\circ}$ C) 加热孵育 45min (每隔 10min 取出轻柔震荡混匀, 避免磁珠沉降, 否则影响捕获效果);
- 2) 结合反应结束后, 将 PCR 管从 PCR 仪中取出, 快速离心后在磁力架上放置 1min, 去上清, 取下管子;
- 3) 加入 100 μ L 预热过的 1 \times Wash Buffer 1, 震荡混匀;
- 4) 将 PCR 管放置于磁力架上 1min, 去上清, 取下管子;
- 5) 加入 150 μ L 预热过的 1 \times Wash Buffer S, 震荡混匀, 放入 PCR 仪 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min。
- 6) 将 PCR 管放置于磁力架上 1min, 去上清, 取下管子;
- 7) 重复 5) ~6) 步骤一次, 共进行 2 次高温洗涤;
- 8) 加入 150 μ L 室温的 1 \times Wash Buffer 1, 室温震荡 2min (30s 孵育 30s 震荡交替进行), 然后置于磁力架上, 去上清, 取下管子;
- 9) 加入 150 μ L 室温的 1 \times Wash Buffer 2, 室温震荡 2min (30s 孵育 30s 震荡交替进行), 然后置于磁力架上, 去上清, 取下管子;
- 10) 加入 150 μ L 室温的 1 \times Wash Buffer 3, 室温震荡 2min (30s 孵育 30s 震荡交替进行), 然后置于磁力架上, 去上清, 取下管子;
- 11) 短暂离心, 使用 10 μ L 移液器尽量排除残留液体;
- 12) 加入 20 μ L Nuclease Free Water, 重悬磁珠备用, 无需丢弃磁珠。

(四) Post-PCR

1. 根据下表在 PCR 管配制如下反应体系：

试剂	体积/反应
磁珠混合物（捕获产物）	20 μ L
2 x HiFi HotStart ReadyMix	25 μ L
Post PCR Primers（ILMN-TS）	5 μ L
总计	50 μ L

2. 设置反应程序并运行（热盖 105 $^{\circ}$ C）：

步骤	温度	时间	循环数
1	98 $^{\circ}$ C	45s	1
2	98 $^{\circ}$ C	15s	5-15*
	60 $^{\circ}$ C	30s	
	72 $^{\circ}$ C	30s	
3	72 $^{\circ}$ C	1min	1
4	4 $^{\circ}$ C	HOLD	—

注：* 扩增循环数应根据探针 Panel 的大小而定，理论上目标区域越大，需要的 PCR 循环数越少，尽量使用较少的 PCR 循环数以减少测序数据的重复数据比率。一般推荐按照下表进行循环数的选择：

Panel Size	循环数
>100 Mb	5
50-100 Mb	7
10-50 Mb	8
1-10 Mb	9
500-1000 kb	11
100-500 kb	13
5-100 kb	14
<50 kb	15

3. Post-PCR 产物纯化：

- 1) 提前取出 Purification Beads（纯化磁珠）室温平衡 30 min，恢复室温后彻底振荡混匀。
- 2) 向 50 μ L 扩增产物中加入 1.8 倍体积（90 μ L）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5-10 min。
- 3) 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2 min，直至溶液完全变澄清。

-
- 4) 小心吸弃上清液，保留磁珠。
 - 5) 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
 - 6) 重复步骤 5) 一次。
 - 7) 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
 - 8) 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中。

(五) 文库质检

1) 文库浓度测定

推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。

2) 文库片段大小分布测定

推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qseq-100 生物片段分析仪对构建好的文库进行片段大小分布检测。文库片段主峰约在 375-425 bp 之间。

