

QKGEN[®] 快速 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.....	3
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，同时还可以兼容单链或双链的 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)	储存方法
QKGEN® Fast Hybridization Reagents	QJ10096	Fast Hyb Buffer	1920ul	-20 °C (box 1)
		Enhancer	2880ul	
QKGEN® Universal Blockers Kit (for MGI-DI)	QIU10096	ILMN-TS Universal Blockers	192 μL	
		Human Cot-1 DNA	480 μL	
QKGEN® Post-PCR Primers (for MGI-DI)	QIP10096	Post PCR Primers (ILMN-TS)	480 μL	
		2x HiFi HotStart Ready Mix	1.2mL x 2	
QKGEN® Fast Wash Buffers	QXT10096	Fast Bead Wash buffer	76.8mL	2~8°C (box 2)
		Fast Wash Buffer 1	43.2mL	
		Fast Fast Wash Buffer 2	67.2mL	
QKGEN® Binding and Purification Beads	QBP00096	Streptavidin Binding Beads	4.80 mL	
		DNA Purification Beads	8.64mL	

三、自备材料

名称	描述
探针	推荐使用齐凯基因商品化或定制化探针
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	--

2. 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) Streptavidin Beads 和 DNA 纯化磁珠使用前应先提前半小时从 4℃ 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℃ 12 h 损失应 < 0.5 μL，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. 关于杂交文库

(1) 文库 pooling 应根据实验需要，进行多个样本杂交或单一样本杂交。

(2) DNA 文库的总用量最低使用 500ng，推荐总量为 1500ng，也可以用超过 1500ng 的总量，但不大于 4 μg，以提高文库丰富度，降低测序数据的重复率。

4. 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。

5. 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 每次操作尽量保持在要求的相应温度下，避免温度降低。多个样品洗脱时，间隔时间不可过长。

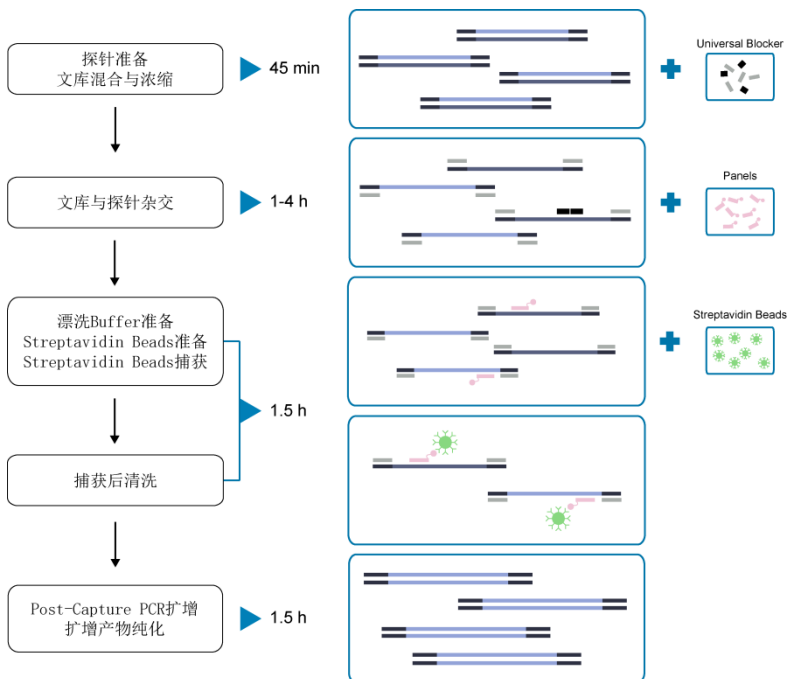
(3) 实验室内环境温度必须稳定在 20 - 25℃，温度过低影响捕获洗脱实验操作的稳定性。

6. 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 1-4 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（此推荐表仅适用于齐凯基因探针，若为其他品牌探针，可根据其厂家建议进行文库 pooling），DNA 文库的总用量最低使用 500ng，推荐总量为 1500ng，也可以用超过 1500ng 的总量，但不大于 4 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	375 ng	1,500 ng
8	187.5 ng	1,500 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
齐凯基因定制化或商品化探针	4 μL
Human cot-1 DNA	5 μL
ILMN-TS Universal Blockers	2 μL
文库 pooling	500 ng~4 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 45 $^{\circ}\text{C}$ ）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
85 $^{\circ}\text{C}$	热盖
95 $^{\circ}\text{C}$	5 min
65 $^{\circ}\text{C}$	1~4 h

2. 将 Fast Hyb Buffer 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 分钟至沉淀溶解。

3. 迅速向已烘干的预杂交体系中加入 20 μL Fast Hyb Buffer, 用指尖轻弹混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5min, 使其充分溶解, 轻轻涡旋 3-5s, 短暂离心, 排除气泡。
4. 缓慢加入 30 μL Enhancer, 使其完全覆盖在杂交 mix 液面上, 将 PCR 反应管立即转移到预热好的 PCR 仪上。
5. 杂交反应。

(三) 洗脱

1. 试剂准备:

- 1) 如 Fast Bead Wash Buffer, Fast Wash Buffer 1 和 Fast Fast Wash Buffer 2 有沉淀, 请置于 48 $^{\circ}\text{C}$ 加热至溶解。
- 2) 将 Fast Wash Buffer 1 置于 68 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上预热, 每个反应需要 450 μL Fast Wash Buffer 1
- 3) 将 Fast Fast Wash Buffer 2 置于 48 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上预热, 每个反应需要 700 μL Fast Fast Wash Buffer 2.

2. 链霉亲和素磁珠准备:

- 1) 提前取出 Streptavidin 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 μL 磁珠至 1.5ml 离心管中。
- 3) 加入 200 μL Fast 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 200 μL Fast Bead Wash buffer, 震荡重悬使充分混匀;
- 7) 步骤(二)杂交结束后, 打开 PCR 仪盖子并迅速将杂交液全部转移至平衡好的磁珠中。

注意: 快速将 PCR 仪中的试剂转移至磁珠中是关键步骤, 请直接在 PCR 仪上样, 不要将杂交管取出防止杂交液温度下降。

3. 洗脱:

- 1) 将加入了杂交液的磁珠在垂直翻转混匀仪上室温充分混匀 30min;
- 2) 将离心管从混匀仪上取下, 快速离心后在磁力架上放置 1min, 去上清, 取下管子;
- 3) 加入 200 μL 预热的 Fast Wash Buffer 1, 混匀; 68 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min;
- 4) 将离心管放置于磁力架上 1min, 去上清, 取下管子;
- 5) 重复 3) - 4) 步骤一次, 使用 Fast Wash Buffer 1 清洗磁珠共计 2 次。

- 6) 最后一次加入清洗液 1 孵育 5min 后, 转移液体至一个新管子; 磁力架上放置 1min, 去上清, 取下管子;
- 7) 加入 200 μ L 预热过的 Fast Fast Wash Buffer 2, 枪头混匀; 48 $^{\circ}$ C 孵育 5 min;
- 8) 将离心管放置于磁力架上 1min, 去上清, 取下管子;
- 9) 重复 7) -8) 步骤两次, 使用 Fast Fast Wash Buffer 2 清洗磁珠共计 3 次。
- 10) 最后一次, 用 10 μ L 枪头吸干净洗液;
- 11) 加入 20 μ L 无核酸酶水, 重悬磁珠混匀, 取 20 μ L 进行 post-PCR 反应。

(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 DNA 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 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。