

# 探针杂交捕获操作说明书 V3

For NGS DNA Library

(10X 洗液标准版)



上海何因生物科技有限公司

仅供科研使用 V3-20230912

## 特别说明

本杂交捕获操作说明书是何因生物液相探针捕获体系操作指南。可以通配 illumina<sup>®</sup> 或 MGI<sup>®</sup> 等测序平台文库，部分操作步骤有区别。若有疑问请与我司联系。

上海何因生物科技有限公司保留解释权。

操作说明中提及的 illumina<sup>®</sup>、MGI<sup>®</sup>、Qubit<sup>®</sup>、Axygen<sup>®</sup>等商标权归相应公司所有。

## 版本更新说明

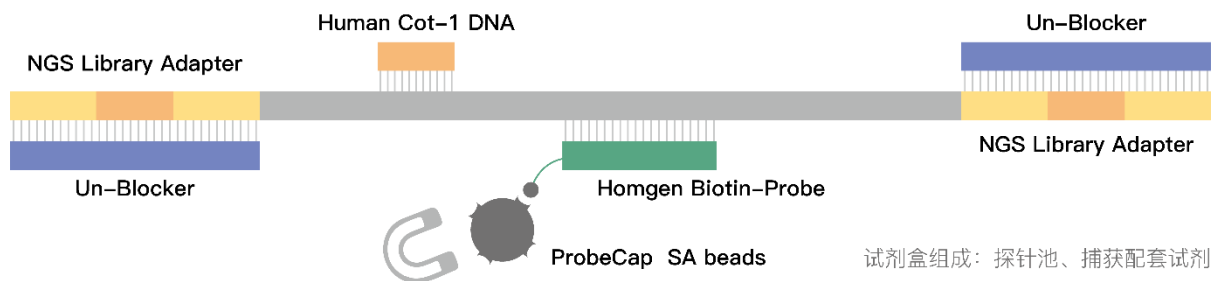
版本	更新日期	版本更新内容
V3-20230912	2023 年 9 月	<p>增加 NGS 靶向捕获全流程实验概要</p> <p>排版更新, 调整目录, 增加#可设置暂存点#步骤</p> <p>增加 Human Cot-1 DNA 用量使用说明表格</p> <p>WES 探针磁珠使用量</p> <p>变更公司地址信息</p>
V2-20210818	2021 年 8 月	<p>调整 ProbeCap WASH&amp;HYB KIT 中 HYB-Buffer 和 Enhancer 比例</p> <p>增加 Panel 部分产品 如: HRD HRR 等</p> <p>变动相关试剂标准装量体积</p> <p>变动: 一处 WI 单次使用量 125 <math>\mu</math>L<math>\rightarrow</math> 120 <math>\mu</math>L ; 另一处 WI 、 WII、 WIII 单次使用量 160 <math>\mu</math>L<math>\rightarrow</math> 150 <math>\mu</math>L</p> <p>变更 LOGO 等 VI 信息</p> <p>Primer-P5P7 修改为 TS-P5P7, 增加 NXT-P5P7</p>
V2-20210630	2021 年 6 月	<p>增加 MGI 平台文库操作步骤</p> <p>增加 MGI 文库杂交捕获相关试剂</p> <p>配套试剂包装变更: 由 SET A/B/C 变更为 ProbeCap WASH&amp;HYB KIT, ProbeCap SA Beads BOX, POST-PCR BOX, 通用 Blocker</p> <p>调整相关表述</p>
V2-20210108	2021 年 1 月	<p>增加相关自备试剂</p> <p>增加附录: Q&amp;A</p>
V1-20200210	2020 年 3 月	原始版本

## 目录

捕获系统介绍	2
ProbeCap® 产品优势	2
Panel 试剂盒组成	3
Panel 产品扩增循环数参考表	4
杂交捕获配套试剂组成	5
NGS 靶向捕获全流程实验概要	6
ProbeCap® 杂交捕获实验操作	7
一、实验前准备	7
二、文库混合和封闭浓缩	8
三、文库杂交	9
四、准备洗脱液	10
五、准备链霉亲和素磁珠	11
六、磁珠捕获	12
七、洗脱	13
八、POST-PCR	14
九、产物纯化	16
十、捕获文库质检	16
附录	17
Q&A	17

## 捕获系统简介

ProbeCap<sup>®</sup> 是上海何因生物科技有限公司（简称何因生物、Homgen<sup>®</sup>）自主研发拥有知识产权的液相杂交捕获系统。该系统由 90~130 的 DNA 探针和杂交捕获配套试剂组成。何因生物自主研发的探针设计算法、探针制备技术、快速杂交模式。探针稳定性极强，纯度高，保证了质量的稳定，从而获得卓越的捕获效率和均一性。同时我们 DNA 探针制备组合技术可以满足灵活的 Panel 区域后期增加需求。



### ProbeCap<sup>®</sup> 杂交捕获原理示意图

## ProbeCap<sup>®</sup> 产品优势

- 快速杂交模式：将常规的 16~24 h 杂交，缩短至 0.5~4 h。
- 研发的高性能接头封闭序列 Blocker，节省操作时间和减少人为实验操作失误。
- UMI 标签的加入，提供检测准确性，适用于液态活检样本的高深度检测。
- 多平台匹配：适配 MGI<sup>®</sup>单 index、双 index 文库、illumina<sup>®</sup>文库。
- 样本兼容性广：适用于石蜡切片、组织，白细胞，cfDNA，胸腹水等各类型样本检测。
- 自主研发的通用封闭序列（Blocker）可以封闭 6~10nt 单双端 index 的文库接头。

## Panel 试剂盒组成

组分	明细	备注
探针盒	<b>XXX</b> Probe	-20°C 保存
杂交捕获配套试剂套装 Cat: P10006	ProbeCap WASH&HYB KIT	-20°C~8°C 保存
	ProbeCap SA Beads BOX	2~8°C 保存
	通用 Blocker *	-20°C 保存
	POST-PCR BOX *	-20°C 保存

- \* 通用 Blocker 和 POST-PCR BOX 组分根据不同 NGS 文库而不同：适配 illumina®文库、MGI®单 index 文库、MGI® 双 index 文库。请注意区分。

## 产品 Panel 扩增循环数参考表

产品名称	货号	1~2 杂 500ng~1μg	3~4 杂 1.5~2μg	5~8 杂 2.5~4μg	9~12 杂 4.5~6μg
Cancer Panel 650	P10001	13	12	11	10
Human HRD-HRR Panel	P10002	11	10	9	8
Cancer SD-160 Panel	P10003	14	13	12	11
Cancer SLC Panel	P10004	15	14	13	12
BRCA 1/2 CDS Panel	P10005CDS	16	15	14	13
BRCA-LGRSNP Panel	P10005LGR	14	13	12	11
Cancer NBC Panel	P10013	13	12	11	10
Cancer HRR Panel	P10014	14	13	12	11
HLA-Small Panel	P10011	15	14	13	12
Human Y Panel	P10015	11	10	9	8
Hi-Exon 35 Panel	P10016	10	9	8	7
Cancer HRD Panel	P10017	11	10	9	8
CHRMT Panel	P10019	13	12	11	10
BCP1100Plus Panel	P10021	13	12	11	10
NBC768 Panel	P10022	13	12	11	10

## 杂交捕获配套试剂套装

### ProbeCap WASH&HYB KIT

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
HYB-Buffer	120 $\mu$ L	960 $\mu$ L	-20~8 $^{\circ}$ C
Human Cot-1 DNA *	60 $\mu$ g	500 $\mu$ g	-20 $^{\circ}$ C
Enhancer	24 $\mu$ L	192 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
2X BWB	1500 $\mu$ L	12 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WI	324 $\mu$ L	2.6 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WII	180 $\mu$ L	1.44 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WIII	180 $\mu$ L	1.44 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10 S-W	360 $\mu$ L	2.88 mL	-20~8 $^{\circ}$ C

### ProbeCap SA Beads BOX

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
ProbeCap SA Beads	60 $\mu$ L	5 mL	2~8 $^{\circ}$ C

### POST-PCR BOX For ILMN Truseq

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
2X HIFI-Enzyme (Pro)	300 $\mu$ L	2*1200 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
TS-P5P7 /NXT-P5P7	24 $\mu$ L	192 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C

### POST-PCR BOX For MGI-Single-Index / For MGI-Dual-Index

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
2X HIFI-Enzyme (Pro)	300 $\mu$ L	2*1200 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
MGI-SI-FR / MGI-DU-FR	24 $\mu$ L	192 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C

### 通用 Blocker

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
Un-Blocker / MGI-Blocker /MGI-Dual-Blocker *	24 $\mu$ L	192 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C

\* Un-Blocker (Cat: P10007) / MGI-Blocker (Cat: P10008) /MGI-Dual-Blocker (Cat: P10012) / Human Cot-1 DNA (Cat: P90002COT), 具有兼容性, 可单独包装销售。



## NGS 靶向捕获全流程实验概要

	步骤	备注	时间流
NGS 文库构建	DNA 片段化 DNA 末端修复 DNA 连接		
	PCR 加 UDI-index	超声或者酶切打断 DNA	参考相应建库试剂盒
	NGS 文库质检		
NGS 杂交捕获	文库混合、封闭、浓缩	耗时取决于文库总体积	可设置暂存点*
	文库杂交		0.5~16 h
	洗液准备	文库杂交完成前 20 min 开始准备	15 min
	磁珠准备	文库杂交完成前 15 min 开始准备	15 min
	磁珠捕获		45 min
	洗脱	分 65°C 热洗和室温洗	30 min 30~45 min
	POST-PCR		可设置暂存点*
	产物纯化	POST-PCR 完成前 5 min 新鲜配置好 80%乙醇	可设置暂存点*
	捕获文库质检		20 min

**可设置暂存点\***: 是指该步骤完成时, 可根据实验时间安排暂存。后续等待下一步操作。

# ProbeCap<sup>®</sup> 杂交捕获实验操作

## 一、实验前准备

### 1, DNA 文库准备

以基因组 DNA 为模板，采用酶切或者超声打断 DNA，然后使用商品化 DNA 文库构建试剂盒构建 NGS 文库，具体参考相应建库试剂盒说明书（推荐何因生物 Homgen Universal DNA Library Prep Kit，货号 PK10002HG-96）。cfDNA 样本建议使用带 UMI 标签的建库接头（何因生物 UMI-ILMN-TS 货号 AB10011-100）。使用 Qubit<sup>®</sup>定量浓度，安捷伦 2100 分析仪确定文库片段范围。文库片段大小以 250~450bp 为主，文库总量不低于 500 ng。

### 2, 用户自备试剂（不包含在本试剂盒内）

片段筛选磁珠（可选 Homgen DNAClean Beads 何因生物 Cat: P10010-60/450）；  
Qubit 定量试剂（可选 QuDye Hs dsDNA Kit 何因生物 Cat: P10009）；  
Nuclease-Free Water 、 TE Buffer 、无水乙醇。

### 3, 必要的仪器设备及耗材

#### 1) 仪器

真空旋转蒸发仪、涡旋振荡器、微型离心机、计时器、PCR 仪（可设定热盖温度，建议 2 台）、恒温金属振荡仪、磁力架（可选何因生物 Cat: Q10001）、Qubit<sup>®</sup>定量仪、电泳仪、安捷伦 2100 分析仪或同类产品（可选）。

#### 2) 耗材

**低吸附无核酸酶** 0.2 mL PCR 管（8 联排 PCR 管）、0.5 mL 离心管、0.8 mL 离心管、1.5 mL 离心管、无核酸酶带滤芯吸头等。

注：因在较高温度下长时间杂交反应，请注意 PCR 管或 8 联排 PCR 管内液体发生蒸发现象，推荐使用 Axygen<sup>®</sup> PCR-0208-C 或生工 F601552 等同类产品。

## 二、文库混合、封闭与浓缩

### 1, 试剂准备

Human Cot-1 DNA 和 Un-Blocker / MGI-Blocker /MGI-Dual-Blocker : 从-20°C 冰箱取出, 室温 (15~25°C) 下, 冰上自然融化。

2, 按下表比例将试剂与文库混合在 0.2 mL PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中。

试剂组分	质量或者体积
单文库或者混合文库	500 ng *
Human Cot-1 DNA	5 $\mu$ g **
Un-Blocker / MGI-Blocker /MGI-Dual-Blocker	2 $\mu$ L

\* 建议每个文库投入量是 500 ng, 多杂时由于文库片段分布范围差异、定量差异, 过多文库杂交可能上机测序后, 文库产出不均一的概率增大。

\*\* Human Cot-1 DNA 浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ L, 0~2 $\mu$ g 之间杂交文库, 加 5  $\mu$ L。2~4 $\mu$ g 之间杂交文库, 加 10 $\mu$ L。4~6 $\mu$ g 之间杂交文库, 加 15 $\mu$ L, 以此类推。

#### Human Cot-1 DNA 使用量推荐表:

单次反应文库总投入量	文库 $\leq$ 2 $\mu$ g	2 $\mu$ g < 文库 $\leq$ 4 $\mu$ g	4 $\mu$ g < 文库 $\leq$ 6 $\mu$ g
Human Cot-1 DNA 使用量	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	15 $\mu$ L

3, 涡旋振荡以上反应液, 瞬时离心使反应液在管底。

4, 将 0.2 mL PCR 管 (8 联排 PCR 管) 置于真空旋转蒸发仪中, 55~60°C 蒸干反应液。# 可设置暂存\* # 密封蒸干离心管文库可 4°C 过夜保存。

### 三、文库杂交

- 1, 从冰箱中取出以下试剂, 在室温下, 冰上自然融化:

HYB-Buffer

Enhancer

**XXX** Probe (Panel 探针)

备注: 若 HYB-Buffer 出现结晶, 可 65 °C 预热, 并间隔振荡混匀, 充分溶解后恢复至室温再使用。

- 2, 向【步骤二、4】中蒸干的 0.2 mL PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中加入以下试剂。(16  $\mu$ L 反应体系)

组分 COMPONENT	体积 VOLUME
HYB-Buffer	10 $\mu$ L
Enhancer	2 $\mu$ L
Probe (Panel 探针) *	2 $\mu$ L / 4 $\mu$ L
Nuclear-Free H <sub>2</sub> O **	2 $\mu$ L / 0 $\mu$ L

\* 探针的合成方式和稀释方式不同, 每个反应加入的量不同, 具体见 Panel 探针说明书和 Panel 探针标签。

\*\* 探针加 2 $\mu$ L 时需要补 Nuclear-Free H<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L ; 探针加 4  $\mu$ L 时不需要补 Nuclear-Free H<sub>2</sub>O。

- 3, 移液器吸打或振荡充分混匀上步骤 PCR 管中的反应液, 室温放置 5~10 min; 再次使用移液器吸打/振荡混匀, 瞬时离心。

- 4, 置于提前设置好的 PCR 仪中进行 95°C 孵育。PCR 热盖温度为 105°C。

步骤 STEP	温度 T °C	时间 TIME
Step1	95	5 min

- 5, 取出上步骤 PCR 管, 涡旋振荡混匀。瞬时离心。立刻进行以下步骤。

- 6, 置于提前设置好的 PCR 仪中进行 65°C 孵育, PCR 热盖温度为 75°C。

步骤 STEP	温度 T °C	时间 TIME
Step1	65	>30 min ; 推荐 2~4 h *

\* 常规样本 65°C杂交孵育 2 h 以上即可达到预期的捕获性能，可以根据整体实验周期安排杂交时间延长至 4 h 或者过夜杂交。

注：为考虑实验连贯性，95 °C孵育和 65 °C杂交建议使用 2 台 PCR 仪器上操作，并提前设置好程序，注意设置 75 °C热盖温度。PCR 仪不可换成水浴锅。

#### 四、准备洗脱液

当杂交反应大于 2 个时，请使用排枪和 8 联排 PCR 管操作。

从-20°C冰箱中取出以下 Buffer 试剂于室温（15~25 °C）融化。

2X BWB

10X WI \*

10X WII

10X WIII

10X S-W \*

\* 10X WI 和 10X S-W 可能出现沉淀，可 50~65 °C下预热、助融，摇匀溶解。

根据当次实验杂交反应数，按照以下方式配置 Buffer。

单个杂交反应（1 rxns） Buffer 配置表（理论）			
Buffer 名称	Buffer 原液体积 $\mu\text{L}$	+dd H <sub>2</sub> O 体积 $\mu\text{L}$	总体积 $\mu\text{L}$
2X BWB	125	125	250
10X WI	27	243	270
10X WII	15	135	150
10X WIII	15	135	150
10X S-W	30	270	300

1, 以下试剂在**室温**下放置

WI: 上述配置的; 150  $\mu\text{L}$ /rxns, **室温 (15~25°C)** 下使用。

WII: 上述配置的; 150  $\mu\text{L}$ /rxns, **室温 (15~25°C)** 下使用。

WIII: 上述配置的; 150  $\mu\text{L}$ /rxns, **室温 (15~25°C)** 下使用。

2, 以下操作后的试剂在杂交 PCR 仪 **65 °C**上预热至少 **15 min** 后使用。

S-W: 2 次用量。取杂交反应 2 倍数量的 PCR 管 (8 联排 PCR 管), 每管加入 150 $\mu\text{L}$ , 置于 PCR 仪 65°C上预热使用。

WI: 1 次用量。取杂交反应同等数量的 0.2 mL PCR 管 (8 联排 PCR 管), 每管加入 120  $\mu\text{L}$ , 置于 PCR 仪 65°C上预热。

备注: **当次实验, 配置后的 1X Buffer: WI 需要放置在 2 个温度下使用:** 室温 (15~25°C) 和 65°C, 注意区分。配置的 1X Buffer 体系在 4°C~室温下保持稳定 30 天。

## 五、 准备链霉亲和素磁珠

链霉亲和素磁珠即 SA 磁珠 (ProbeCap<sup>®</sup> SA Beads, 简称 SA Beads) 提前 10min 准备即可, 避免长时间室温放置。

- 1, 从 4°C 冰箱取出 ProbeCap<sup>®</sup> SA Beads (链霉亲和素磁珠) 后, 室温放置 10min, 平衡体系。
- 2, 涡旋振荡 15 sec 充分混匀。
- 3, 按每个杂交反应 (1 rxns) 使用 50  $\mu\text{L}$  SA Beads\*\*液, N 个杂交反应应取 50\*N  $\mu\text{L}$  SA Beads 液, 转入 1.5 mL 离心管中。

**\*\*:**全外 (WES) 样本做杂交时, 按每个杂交反应 (1 rxns) 使用 **100  $\mu\text{L}$  SA Beads 液**

- 4, 将上步骤中含 SA Beads 液的 1.5 mL 离心管置于磁力架上使得磁珠与溶液彻底分离。

- 5, 使用移液器吸取上清, 丢弃。保留离心管中的 SA Beads。
- 6, 准备如下洗脱:
  - 1) 向带有磁珠的管中加入  $N \times 100 \mu\text{L}$  1X BWB, 涡旋振荡。避免振荡到管外。
  - 2) 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上, 使磁珠与溶液完全分离。移液器吸取上清, 丢弃上清, 保存 SA Beads 在离心管中。
- 7, 重复以上步骤【6】一次。
- 8, 按 N 个杂交反应取  $N \times 50 \mu\text{L}$  1X BWB 加入上步骤含 SA Beads 的离心管中, 移液器吸打, 充分混匀。
- 9, 将上步的 SA Beads 混合液, 按每个杂交反应  $50 \mu\text{L}$  分装至新的 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中。**(注意做好对应 PCR 管标记)**

## 六、文库与链霉亲和素磁珠结合

- 1, 将步骤【五、9】中得到的含 SA Beads 混合液的 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 置于磁力架上, 使 SA 磁珠与溶液分离, 吸取上清, 丢弃; 保留 SA 磁珠。
- 2, 立刻将上步骤中含 SA 磁珠的 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 置于  $65^{\circ}\text{C}$  的 PCR 上。
- 3, 将步骤【三、6】中完成杂交反应的  $16 \mu\text{L}$  反应液全部转移至上步骤对应编号的 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中。使用移液器吸打 10 次混匀。
- 4, 关上 PCR 盖, 继续反应 30 min。热盖温度依旧设置  $75^{\circ}\text{C}$ 。期间每 10min, 取出 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 振荡 5 sec, 立刻放回 PCR 仪, 直至满足 30 min 总反应时间。

步骤 STEP	温度 T °C	时间 TIME
Step1	65	30 min

## 七、洗脱

该步骤目的是洗脱未结合的 DNA 文库，

### 1, 准备 65 °C热洗脱

此过程除使用磁力架吸附操作外，其余 PCR 管（8 联排 PCR 管）均在 65°C 的 PCR 的仪器上操作。

- 1) 向步骤【六、4】完成后的 PCR 管（8 联排 PCR 管）中加入 120  $\mu$ L 的 65°C 预热的 1X WI 洗液。使用移液器反复吸打均匀。65 °C 孵育 10 ~ 20 sec。
- 2) 将上步骤的 PCR 管（8 联排 PCR 管）放置在磁力架上，使 SA 磁珠与溶液分离，吸取上清、丢弃至废液桶。  
(建议废液桶中含有一定比例的 0.1% 的次氯酸钠溶液)。
- 3) 使用 **S-W 清洗** 上步骤 SA 磁珠
  - ① 向上步骤 PCR 管（8 联排 PCR 管）加入 150  $\mu$ L 65°C 预热的 1X S-W 洗液，缓慢吸打 10~15 次，充分悬浮 SA 磁珠。(不可剧烈振荡，避免产生气泡)
  - ② 将 PCR 管（8 联排 PCR 管）放回至 PCR 仪上 65°C 精准计时孵育 5 min。
  - ③ 将 PCR 管（8 联排 PCR 管）置于磁力架上，使 SA 磁珠与溶液分离，**迅速吸取上清丢弃至废液桶。**
- 4) 重复上步骤 **S-W 清洗** 1 次。**2 次 S-W 清洗间隔时间尽量短。**

### 2, 准备室温洗脱

- 1) 取配置好的室温下 150 $\mu$ L 1X WI 洗液，加入至上步骤的含 SA 磁珠的 PCR 管（8 联排 PCR 管）中，合计涡旋 2 min（每涡旋 30 sec，暂停 3 sec），充分悬浮磁珠。
- 2) 将上步骤的 PCR 管（8 联排 PCR 管）置于磁力架上，待磁珠与溶液分开，吸



取上清，丢弃上清。

- 3) 取已配置室温下的 150  $\mu$ L 1X W II 洗液，加入到上步骤含 SA 磁珠的 PCR 管（8 联排 PCR 管）中，涡旋 1min（每涡旋 30 sec，暂停 3 sec），充分悬浮磁珠。
- 4) 将上步骤的 PCR 管（8 联排 PCR 管）置于磁力架上，待溶液澄清，弃上清。
- 5) 取配置好的室温下 150 $\mu$ L 1X WIII 洗液，加入到上步骤的含 SA 磁珠的 PCR 管（8 联排 PCR 管）中，使用移液器吸打混匀。
- 6) 转移至新的对应编号的 PCR 管（8 联排 PCR 管）中，置于磁力架上，待磁珠与溶液分离，丢弃上清，保留磁珠。

### 3, 重悬浮磁珠

- 1) 将上步骤 PCR 管（8 联排 PCR 管）从磁力架上移开，加入 23  $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O，用于步骤【八、1】。**不要丢弃磁珠。**（用于下一步带 SA 磁珠扩增）

## 八、 POST-PCR

- 1, 根据文库类型，在 PCR 管（8 联排 PCR 管）中按以下体积配置体系（50  $\mu$ L）。试剂需室温下，冰上自然融化后使用。

组分 COMPONENT	体积 VOLUME
2X HIFI Enzyme (Pro)	25 $\mu$ L
TS-P5P7 / MGI-SI-FR / MGI-DU-FR *	2 $\mu$ L
磁珠混合液（步骤七、3、1）的）	23 $\mu$ L

\* MGI / illumina 等不同测序平台文库，使用的产品不一样，请注意区分。

- 2, 简短涡旋，轻甩，保证磁珠依旧悬浮于溶液中。
- 3, 将 PCR 管（8 联排 PCR 管）置于 PCR 仪中。热盖设置 105  $^{\circ}$ C。按照以下程序进行 PCR 扩增。

Step	T °C	Time	Cycles
Initial denaturation	98	45 sec	1
Denaturation	98	15 sec	12 **
Annealing	57 / 50 *	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final extension	72	1 min	1
Hold	4	∞	1

\* 退火温度 illumina 文库采用 57°C，MGI 文库采用 50°C。

\*\* 不同 Panel 的基础循环数有差异。同一个 Panel，文库投入量越多，循环数需相应减少 1~2 个 cycles。具体可参考下表（标准产品循环数 cycles 见封面第二页）

Panel 探针数量(1X)/ Panel 大小 (Kb / Mb)	1~2 杂 500ng ~ 1µg	3~4 杂 1.5 ~ 2µg	5~8 杂 2.5 ~ 4µg	9~12 杂 4.5 ~ 6µg
MRD	17~18	/	/	/
1000 以下 / 100Kb 以下	15	14	13	12
1000~4000 / 100Kb~400Kb	14	13	12	11
4000~20000 / 400Kb~2Mb	13	12	11	10
20000~100000 / 2Mb~10Mb	12	11	10	9
WES 全外	10	9	8	7

4, 上步骤 PCR 扩增后取 1µL 使用 Qubit®测量浓度。# 可设置暂存\* #

POST-PCR 产物可以 4°C暂存过夜。

## 九、 PCR 产物纯化

以下使用的磁珠是 DNA 分选磁珠 (Homgen<sup>®</sup> DNAClean Beads), 也可以使用 AMPure XP Beads 获得同等效果。

- 1, 新鲜配置 80%乙醇, N 个杂交反应需要 N\*100  $\mu$ L。
- 2, 向 PCR 产物中加入 50  $\mu$ L Homgen<sup>®</sup> DNAClean Beads, 涡旋混匀, 室温静置 5min。
- 3, 将 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 置于磁力架上, 使得磁珠与溶液完全分离, 吸取上清, 丢弃上清。
- 4, 上步骤得到的 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中每个加入 80%乙醇 100  $\mu$ L, 将 PCR 管置于磁力架上来回吸附 1~2 次, 使得 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中的磁珠被 80%乙醇充分洗涤。
- 5, 再使用磁力使磁珠和溶液分离, 充分吸取上清, 丢弃上清, 晾干 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 中溶液或者使用 60 $^{\circ}$ C, 1~2min 烘干。
- 6, 加入 25  $\mu$ L 超纯水或 0.1X TE Buffer。使用移液器充分悬浮磁珠, 静置 5 min。置于磁力架上, 使得磁珠与溶液分离。将上清移至新的标记的 EP 管中。**(请注意此步骤涉及转至新的 EP 管, EP 管需要做好对应标记)** #  
**可设置暂存\*** # PCR 纯化产物可以 4 $^{\circ}$ C 暂存过夜。

## 十、 捕获文库质检

- 1, 步骤【九、6】中得到的文库, 使用 Qubit<sup>®</sup> 荧光定量仪进行定量。使用安捷伦 2100 分析仪对文库峰型进行质检。

注: 文库质控参考标准: Qubit 浓度不低于 1 ng/ $\mu$ L; 文库片段大小在 250~450bp, 无 Dimer 污染, 无杂峰。

- 2, 文库质检通过后, 可以安排上机测序或者-20 $^{\circ}$ C保存。

附录:

## Q&A

### Q1: 杂交文库混合有哪些需要注意的?

A: 需要先判定文库片段分布范围: 同类型的文库按照数据量比例结合文库分布进行混合。不同类型的文库建议分开杂交。例如 cfDNA 文库混合在一个杂交反应, 白细胞文库混合在一个杂交反应, FFPE 样本文库混合在一个杂交反应。

### Q2: Human Cot-1 DNA 加入量是多少?

A: 1 个杂交反应中每 2  $\mu\text{g}$  总文库加入 5  $\mu\text{g}$  Human Cot-1 DNA。即: 文库投入量 $\leq 2\mu\text{g}$  加入 5 $\mu\text{g}$  Human Cot-1 DNA;  $2\mu\text{g}\leq$ 文库 $\leq 4\mu\text{g}$  加入 10  $\mu\text{g}$  Human Cot-1 DNA。

### Q3: HYB-Buffer 出现结晶如何处理?

A: HYB-Buffer 储存条件是 $-20^{\circ}\text{C}$ , 使用时需要恢复至室温, 若出现结晶,  $65^{\circ}\text{C}$ 助融, 间隔振荡至充分溶解, 液体澄清即可。

### Q4: $95^{\circ}\text{C}$ 变性时, PCR 未设置热盖温度或热盖温度低于 $95^{\circ}\text{C}$ 会有什么影响?

A: 杂交液蒸发损失, 导致总体积不足, 导致捕获效率降低、数据均一性差。

### Q5: 杂交捕获对 PCR 仪器有什么要求?

A: 市面上部分 PCR 仪在热盖温度没有到达指定温度时, 将反应温度降低  $8\sim 15^{\circ}\text{C}$ , 等反应温度上升到指定温度才上升热盖温度, 使用此类 PCR 需注意等待热盖温度达到要求温度范围。

B: 使用 2 台 PCR 仪器操作, 分别先设置好 2 个不同的温度并提前运行 PCR 仪器至指定温度。可以在一体 2 仓式 PCR 仪的 A/B 同时设置不同反应温度和热盖温度完成反应。

### Q6: 杂交液与链霉亲和素磁珠结合多长时间最合适? 结合时间小于 30 min 或者大于 1 h 会有什么影响。

A: 杂交液与链霉亲和素磁珠结合  $30\sim 45\text{min}$  为最佳, 因磁珠容易沉降, 因此每隔 10min 需要振荡混匀。

B: 结合时间小于 20 min, 导致磁珠吸附片段偏少, 扩增浓度较低。

C: 结合时间超过 1 h, 对实验没有太大的影响。

**Q7: 杂交捕获热洗哪些注意事项?**

A: 65 °C热洗除了在磁力架上吸附外, 其余均在 65 °C的 PCR 仪上完成。

B: 磁力架上吸附尽量时间短, 磁力吸附后, 尽快吸取上清, 丢弃上清后, 尽快将 PCR 管 (8 联排 PCR 管) 放在 PCR 仪器上, 加入 65 °C洗液, 吸打混匀。

C: S-W 热洗时要轻轻吸打, 不可以剧烈振荡、产生气泡。

D: S-W 热洗时间要严格控制在 5min, 为保证多个样本反应的均一性, 请使用排枪操作, 切忌单管逐一操作。

E: S-W 热洗 2 次, 2 次间隔时间要短, 操作反应迅速。

**Q8:热洗时, WI 热洗时间少于 10 sec 或者多于 20sec 有什么影响?**

A: WI 热洗少于 10 sec, 热洗不充分有非特异性文库残留。

B: WI 热洗多于 20 sec, 热洗时间长了, 数据均一性差。

**Q9: 杂交捕获热洗时 S-W 热洗时间少于 5min 或者多于 5 min 会有什么影响?**

A: S-W 热洗时间小于 5min: 热洗不充分有非特异性残留, 捕获效率低; S-W 热洗时间多于 5min: 后续扩增浓度会偏低, 均一性差。

**Q10: 室温洗为何要转管?**

A: 室温洗长时间的振荡主要去除未结合的非特异性片段, 这些片段可能残留于管壁和管盖, 转管便于减少非特异性文库。

**Q11: 10X WI 和 10X S-W 结晶沉淀如何处理?**

A: 10X WI 和 10X S-W 存储温度是-20°C, 室温融化后可能有结晶, 可以使用 55~65°C助融、充分溶解至液体澄清, 在室温下再使用。

**Q12: 环境温度对杂交捕获有影响吗?**

A: 环境温度对杂交捕获有一定影响的: 冬天温度低, 建议开空调, 让室温保存在 15~25°C。夏天实验室, 禁止空调出风口直接对吹 PCR 仪。

**Q13: 捕获扩增纯化后浓度低的原因有哪些?**

A: 文库投入量低, 文库质检差; 样本有污染。

B: Enhancer 使用过大

C: 杂交体系体积不足 16 $\mu$ L

D: 杂交时间不足

E: 探针失效

F: 热洗时间过长

G: 纯化磁珠体积不足, 回收率低

H: 环境温度低

**Q14: 纯化扩增浓度过高原因有哪些 ?**

A: 文库投入量多大

B: 循环数过多

C: Blocker 或者 Human Cot-1 DNA 忘记添加或者投入量不足

D: Enhancer 加入量不足

E: 热洗温度低于 65°C, 导致非特异性片段残留。

**Q15: 捕获均一性差的原因有哪些?**

A: 热洗时间不严格, 出现从 65°C 降至室温, 再升到 65°C 的问题

B: 杂交体系的体积不是 16 $\mu$ L

C: 热洗时间过长

D: 环境温度不稳定

E: FFPE 样本的质量问题或者原始样本存在被微生物菌类污染问题。

**Q16: 文库的浓缩是否可以由真空旋转浓缩替换成磁珠法浓缩?**

A: 不推荐, 磁珠法浓缩虽然可以一定程度缩短实验时间, 但会产生数据的 GC 偏好。

若需使用磁珠法浓缩, 需要增加 Human Cot-1 DNA 使用, 具体请联系我司。



 何因生物  
For Life & Future