

探针杂交捕获操作说明书

V8.1

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 V8.1-20250418

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[®] 或 MGI[®]

以及 IronTorrent 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[®] 、MGI[®]、Qubit[®]、Axygen[®]等商标权归相应公司所有。

版本更新说明

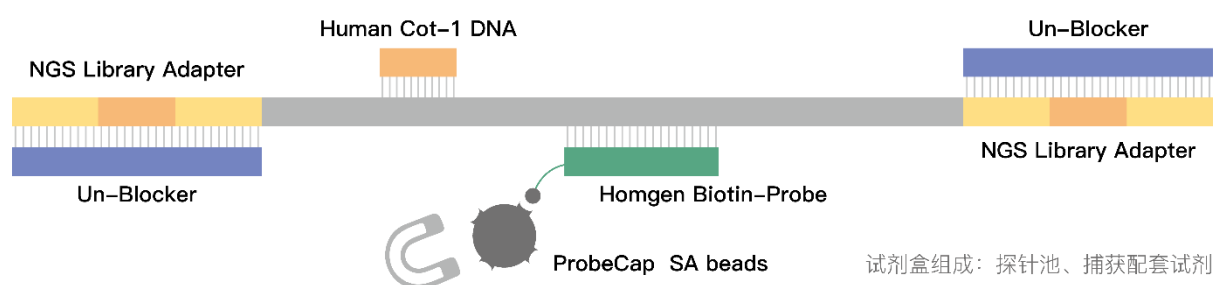
版本	更新日期	更新内容
V8.1-20250418	20250402	更改杂交体系中 Enhancer 使用量, Enhancer 装量及杂交体系总体积 (可选) 添加 HomExon Y15 Probe For Genetics、HomExon C17 Probe For Cancer 等产品相关信息 杂交体系中增加油封操作 (可选步骤, 推荐使用) 增加: 何因八联排 PCR 管 (货号 PQ100003HY)
V7-20250213	20250213	部分文字表述变动、排版更新。
V6-2025103	20250103	添加 Cancer RNAfusion66 Probe 和 Cancer RNAfusion200 Probe 产品相关信息。排版更新。
V5-20241113	20241113	添加 Iron Torrent 平台操作说明
V4-20240201	20240201	磁珠结合增加备注
V3-20230912	2023 年 9 月	增加 NGS 靶向捕获全流程实验概要 排版更新, 调整目录, 增加#可设置暂存点#步骤 增加 Human Cot-1 DNA 用量使用说明表格 WES 探针磁珠使用量 变更公司地址信息
V2-20210818	2021 年 8 月	调整 ProbeCap WASH&HYB KIT 中 HYB-Buffer 和 Enhancer 比例 增加 Panel 部分产品 如: HRD HRR 等 变动相关试剂标准装量体积 变动: 一处 WI 单次使用量 125 μ L $\rightarrow$ 120 μ L ; 另一处 WI 、 WII、 WIII 单次使用量 160 μ L $\rightarrow$ 150 μ L 变更 LOGO 等 VI 信息 Primer-P5P7 修改为 TS-P5P7, 增加 NXT-P5P7
V2-20210630	2021 年 6 月	增加 MGI 平台文库操作步骤 增加 MGI 文库杂交捕获相关试剂 配套试剂包装变更: 由 SET A/B/C 变更为 ProbeCap WASH&HYB KIT, ProbeCap SA Beads BOX, POST-PCR BOX, 通用 Blocker 调整相关表述
V2-20210108	2021 年 1 月	增加相关自备试剂, 增加附录: Q&A
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	11
五、准备链霉亲和素磁珠	13
六、磁珠捕获	14
七、洗脱	15
八、POST-PCR	17
九、产物纯化	19
十、捕获文库质检	20
附录	21
Q&A	21

捕获系统简介

ProbeCap® 是上海何因生物科技有限公司（简称何因生物、Homgen®）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® 杂交捕获原理示意图

ProbeCap® 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®单 index、双 index 文库、illumina®文库、Iron Torrent 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	XXX Probe	-20°C 保存
杂交捕获配套试剂套装 Cat: P10006	ProbeCap WASH&HYB KIT	-20~8°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、Iron Torrent 文库。注意区分。

产品 Panel 扩增循环数参考表

产品名称	货号	1~2 杂 或 500ng~1μg	3~4 杂 或 1.5~2μg	5~8 杂 或 2.5~4μg	9~12 杂或 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
CHMT Panel	P10019	13	12	11	10
BCP1100Plus Panel	P10021	13	12	11	10
NBC768 Panel	P10022	13	12	11	10
HomExon Y15 Probe For Genetics	P10027	11	10	9	8
HomExon C17 Probe For Cancer	P10028	11	10	9	8

产品名称	货号	RNA 文库类型*	1~2 杂 400ng~1μg	3~4 杂 1μg~2μg	5~8 杂 2μg~4μg
Cancer RNAFusion66 Probe	P10031	去除 rRNA 文库	9	8	7
		不去除 rRNA 文库	13	12	11
Cancer RNAFusion200 Probe	P10026	去除 rRNA 文库	8	7	6
		不去除 rRNA 文库	11	10	9

*1, 去除 rRNA 构建的 RNA 文库的 mRNA 含量一般是不去除 rRNA 构建的文库的 10~30 倍; 同等 RNA 文库投入量进行捕获, 去除 rRNA 构建的 RNA 文库方式检测的下限更低。2, 捕获效率指标, 两种方法构建的文库没有实质差异。

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 μ L	960 μ L	-20~8 $^{\circ}$ C
Human Cot-1 DNA *	60 μ L	500 μ L	-20~8 $^{\circ}$ C
Enhancer	30 μ L	240 μ L	-20~8 $^{\circ}$ C
2X BWB	1500 μ L	12 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WI	324 μ L	2.6 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WII	180 μ L	1.44 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10X WIII	180 μ L	1.44 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
10 S-W	360 μ L	2.88 mL	-20~8 $^{\circ}$ C
CoatedOil	300 μ L	1.5 mL	-20~8 $^{\circ}$ C

ProbeCap SA Beads BOX

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
ProbeCap SA Beads	600 μ 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 μ L	2*1200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
TS-P5P7 /NXT-P5P7	24 μ L	192 μ 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 μ L	2*1200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
MGI-SI-FR / MGI-DU-FR	24 μ L	192 μ L	-20 $^{\circ}$ C

POST PCR FOR ION

组分	12 rxns	96 rxns	储存条件
2X HIFI Enzyme (Pro)	300 μ L	2*1200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
PCR-AP PRIMER	48 μ L	384 μ L	-20 $^{\circ}$ C

通用 Blocker

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

* Un-Blocker (Cat: P10007) / MGI-Blocker (Cat: P10008) /MGI-Dual-Blocker (Cat: P10012) / ION-Blocker (Cat: P100025) / 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*
		POST-PCR 完成前 5 min	
	产物纯化	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® 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，采用酶切或者超声片段化，然后使用 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®定量，安捷伦 2100 分析文库片段范围。文库片段大小以 250~450bp 为主，文库总量≥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®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，请确保 PCR 管或 8 联排 PCR 管内液体无蒸发现象，推荐使用何因（货号 PQ100003HY）或 Axygen®（货号 PCR-0208-C）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 / ION-Blocker

从-20℃ 冰箱取出，室温（15~25℃）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
文库总量	500 ng *
Human Cot-1 DNA	5 μ L **
Un-Blocker / MGI-Blocker / MGI-Dual-Blocker / ION-Blocker	2 μ L

*杂交文库总量按照实际样本需求进行混合，多文库混合杂交反应时应充分考虑文库片段范围、定量方式，较多文库混合杂交后，上机测序后，文库产出不均一的概率增大。推荐单个文库投入量 500ng，也可以按照实际操作增减。

** Human Cot-1 DNA 浓度为 1 μ g/ μ L，0~2 μ g 之间杂交文库总量，加 5 μ L。2~4 μ g 之间杂交文库总量，加 10 μ L。4~6 μ g 之间杂交文库总量，加 15 μ 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 μ g	2 μ g < 文库 $\leq$ 4 μ g	4 μ g < 文库 $\leq$ 6 μ g
Human Cot-1 DNA 使用量	5 μ L	10 μ L	15 μ 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℃蒸干反应液。 # 可设置暂存*# 密封蒸干离心管文库可 4℃过夜保存。

此步骤为真空旋转蒸发仪浓缩文库，也可以使用磁珠法浓缩，磁珠法浓缩流程请咨询何因

生物技术支持。

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

CoatedOil (V8.1-20250418 * 可选步骤, 推荐使用)

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。

* V8.1-20250418 * 可选更新, 推荐使用 **16.5 μL 杂交反应体系**

组分 COMPONENT	体积 VOLUME
HYB-Buffer	10 μL
Enhancer	2.5 μL
Probe (Panel 探针) *	2 μL / 4 μL
Nuclear-Free H2O **	2 μL / 0 μL

* V2-20210818 ~ V7-20250213 * **16 μL 杂交反应体系**

组分 COMPONENT	体积 VOLUME
HYB-Buffer	10 μL
Enhancer	2 μL
Probe (Panel 探针) *	2 μL / 4 μL
Nuclear-Free H2O **	2 μL / 0 μL

* 探针的稀释方式不同，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。

** 若：探针加 2 μ L 时杂交体系需要补 Nuclear-Free H₂O 2 μ L；探针加 4 μ L 时不需要补 Nuclear-Free H₂O。

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，在上述步骤的 16.5 μ L 杂交液中加入 10 μ L CoatedOil，加入后瞬时离心无需震荡，使 CoatedOil 浮于杂交液上层。（V8.1-20250418 * 可选步骤，推荐使用）

5，置于提前设置好的 PCR 仪中进行 95 $^{\circ}$ C 孵育。PCR 热盖温度为 105 $^{\circ}$ C。

步骤 STEP	温度 T $^{\circ}$ C	时间 TIME
Step1	95	5 min

6，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：置于提前设置好的 PCR 仪中进行 65 $^{\circ}$ C 孵育，PCR 热盖温度为 75 $^{\circ}$ C。

步骤 STEP	温度 T $^{\circ}$ C	时间 TIME
Step1	65	>30 min；推荐 2~4 h *

* 常规样本 65 $^{\circ}$ 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：为保证实验连贯性，95 $^{\circ}$ C 孵育和 65 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μL	+dd H ₂ O 体积 μL	总体积 μL
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 μL /rxns，室温（15~25°C）下使用。

WII：上述配置的；150 μL /rxns，室温（15~25°C）下使用。

WIII：上述配置的；150 μL /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 150μL，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 μL，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[®] 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[®] 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 μ L SA Beads**液，N 个杂交反应应取 50*N μ L SA Beads 液，转入 1.5 mL 离心管中。

****：全外（Hi-Exon 35 Probe、Hi-Exon 35 V2 Probe 等）样本做杂交捕获时，按每个杂交反应（1 rxns）使用 100 μ 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*100 μ 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*50 μ 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 μ 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°C 的 PCR 仪上。**注：若为多样本多个 8 联排操作，请先单排弃上清后放置 PCR 仪上加入杂交液后再操作下一排。防止多排同时放在 65°C PCR 仪上导致磁珠干掉，影响捕获效率。**
- 3, 将步骤【三、6】中完成杂交反应的 16 μ L / 16.5 μ L（含 Coated Oil 为 26.5 μ 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°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 μ 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 μ 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 μ 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) 取配置室温下的 150 μ 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 150μL 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

将上步骤 PCR 管（8 联排 PCR 管）从磁力架上移开，加入 23 / 21 * μL Nuclease-Free H₂O 用于步骤【八、1】。**不要丢弃磁珠。**（用于下一步带 SA 磁珠扩增）。

- * MGI 文库和 illumina 文库时加入 23 μL Nuclease-Free H₂O ；
- Iron Torrent 文库时，加入 21 μL Nuclease-Free H₂O。

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 μ 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 μ L
TS-P5P7 / MGI-SI-FR / MGI-DU-FR / PCR-AP PRIMER *	2 μ L / 4 μ L
磁珠混合液 (步骤七、3、1) 的)	23 μ L / 21 μ L

*MGI /illumina/Iron Torrent 等不同测序平台文库, 使用的产品不一样, 请注意区分: TS-P5P7/MGI-SI-FR / MGI-DU-FR 使用量为 2 μ L, PCR-AP PRIMER 使用量为 4 μ L。

- 2, 瞬时涡旋, 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 $^{\circ}$ 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 Iron Torrent / illumina 文库采用 57 $^{\circ}$ C, MGI 文库采用 50 $^{\circ}$ 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 大小与 POST-PCR 扩增循环数对照表

Panel 探针数量(1X)/ Panel 大小 (Kb / Mb)	1~2 杂 或 500ng~1μg	3~4 杂 或 1.5~2μg	5~8 杂 或 2.5~4μg	9~12 杂或 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 全外相关产品	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[®] 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 μ L。
- 2, 向 PCR 产物中加入 50 μ L Homgen[®] 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 μ 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°C, 1~2min 烘干。
- 6, 加入 25 μ 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°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[®] 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/μL；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℃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: 单个杂交反应中每 2 μ g 总文库加入 5 μ L Human Cot-1 DNA。即: 文库投入量 $\leq$ 2 μ g 加入 5 μ L Human Cot-1 DNA; 2 μ g $\leq$ 文库 $\leq$ 4 μ g 加入 10 μ L Human Cot-1 DNA。

Q3: HYB-Buffer 出现结晶如何处理?

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

Q4: 95 $^{\circ}$ C变性时, PCR 未设置热盖温度或热盖温度低于 95 $^{\circ}$ 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 8~15 $^{\circ}$ 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 30~45min 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, 注意空调出风口请勿直接对吹 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 μ 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

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C降至室温, 再升到 65 $^{\circ}$ C的问题
- B: 杂交体系的体积不是 16 μ 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 等组分使用, 具体请联系我司。

实验备注:

This image shows a full page of white paper with horizontal dashed lines, typical of primary-ruled notebook paper. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings present.

