

xCapSeq™ RNA 杂交&清洗试剂盒

操作说明书

(Cat#HC010,Version1.2)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co.,Ltd

For Research Use Only.

Not for use in diagnostic procedures.

仅供科研使用

目录

产品概述	1
实验流程	2
产品组成	3
保存及运输条件	3
适用范围	3
注意事项	4
实验前准备	5
实验流程	8
1. 文库杂交封闭	8
2. 文库杂交捕获	9
3. 准备洗脱液	10
4. 准备链霉亲和素磁珠	11
5. 文库与链霉亲和素磁珠结合	12
6. 洗脱未结合文库	13
7. 捕获文库 PCR 富集	14
8. PCR 产物纯化	15
9. 捕获文库质检	15

产品概述

xCapSeq™ 是欣基生物自主研发具有知识产权的靶向捕获产品系列，包括探针定制、杂交&清洗试剂盒、封闭试剂等。xCapSeq™ RNA 探针系统使用高效合成的 120 nt RNA 探针，每条探针具有 Biotin 标记。该探针稳定性极强，探针均采用 Pooling 合成技术，可大幅度提升杂交捕获的质量及稳定性。

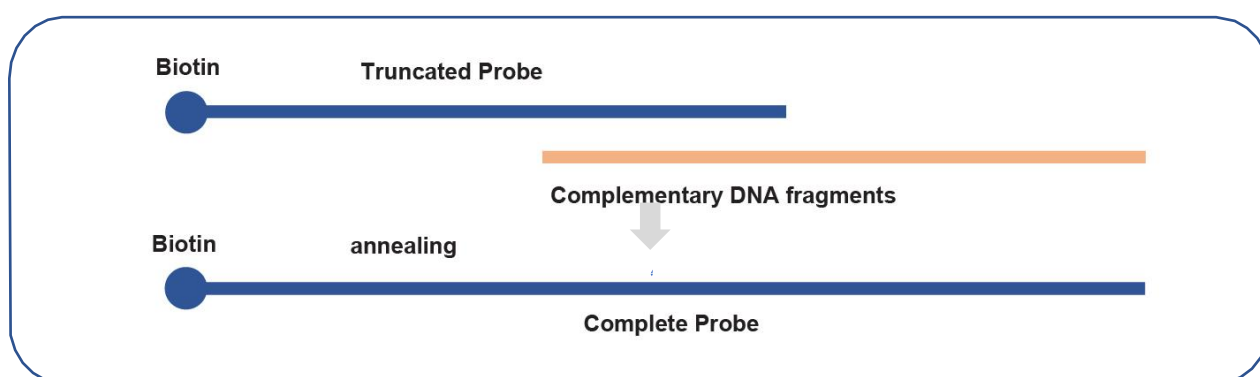


图 1.xCapSeq™ 探针合成示意图

xCapSeq™ RNA 杂交&清洗试剂盒是专门针对 xCapSeq™ RNA 探针系列捕获系列产品开发的配套试剂盒。精心优化的杂交和清洗反应体系，保证了捕获效率的均一性与稳定性。本产品采用了创新的快速杂交模式，将常规 16 ~ 24 h 的杂交时间缩短至 2 ~ 4 h，满足了快速交付的需求。

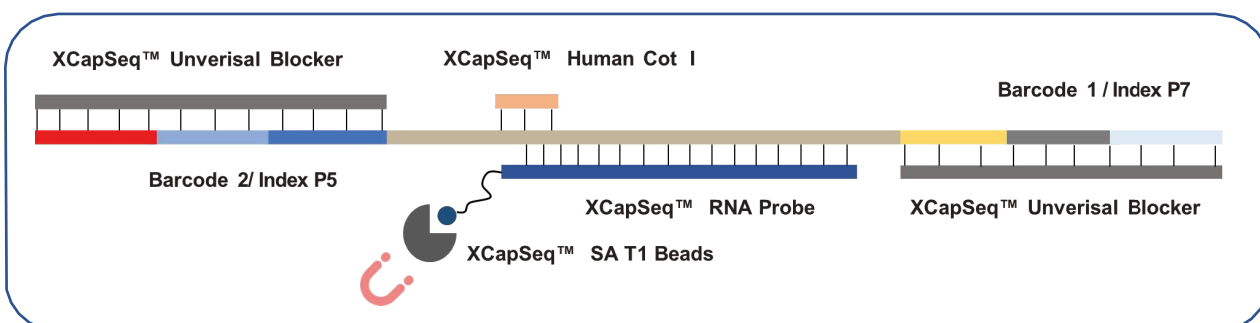


图 2.xCapSeq™ RNA 探针杂交捕获原理图

实验流程

添加 xCapSeq™ Unverisal Blocker
添加 xCapSeq™ Human Cot I

探针杂交

亲和磁珠孵育

非特异性捕获洗脱

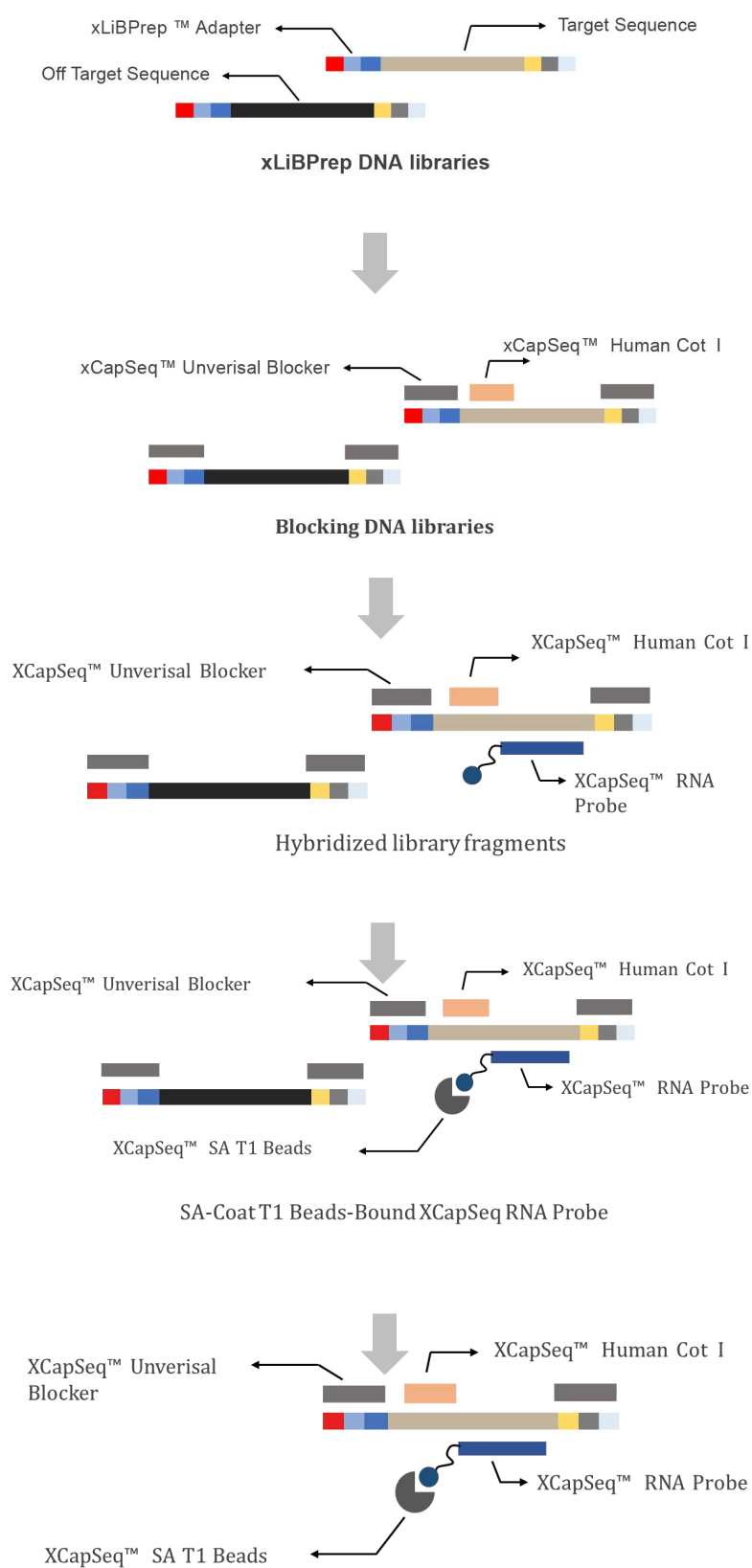


图 3. xCapSeq™ 液相捕获实验流程图

产品组成

主货号：HC010 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns (HC010-024)	96 rxns (HC010-096)
● xCap 2× Hyb Buffer	192 μL	768 μL
● xCap Enhancer Buffer	72 μL	288 μL
● xCap Human Cot I	120 μL	480 μL
○ xCap 10× WB I	480 μL	1.92 mL
○ xCap 10× WB II	1.44 mL	5.76 mL
○ xCap 4× Binding Buffer	3.6 mL	14.4 mL

保存与运输条件

-30~-15 °C保存，≤0 °C运输。

适用范围

本产品适用 RNA 探针目标区域的杂交捕获，以及后续的磁珠结合与清洗，建议与 xCapSeq™ 靶向捕获系列产品配套使用。

注意事项

! 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的吸头、离心管进行实验。
2. 实验开始前先清洁操作台，确保没有 RNA 酶和 DNA 酶的污染。
3. 明确文库接头类型，选择对应 Blocker 类型进行使用，否则无法达到封闭效果，影响探针捕获特异性。
4. 文库真空浓缩过程中，切记不可过度干燥，以免影响探针捕获均一性。
5. 文库在 PCR 仪中进行反应时，切记要按说明书要求设置热盖，避免反应液蒸发至管盖，造成捕获数据质量下降或者实验失败。
6. 亲和磁珠切勿放置冷冻区保存，每次使用严格按照说明书指示操作。
7. 1× WB II 热洗需严格按照实验操作说明进行，每次洗涤过程，需严格把控清洗时间，温度务必维持在 65 °C，利于非特异性文库从磁珠上脱离。
8. 分选磁珠需常温放置 30 min 后使用，以保证磁珠纯化片段大小及浓度的稳定性。

实验前准备

1. DNA 文库制备

以基因组 DNA 为模板，采用超声或酶切法打断 DNA，然后使用商品化 DNA 文库构建试剂盒（推荐 xLiBPreP™ Fast DNA Library Kit 或者 xLiBPreP™ Enzymatic DNA Library Kit）进行文库构建，采用 Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system 或其它同类产品进行文库质检，用 Qubit® 荧光定量仪进行文库定量。具体操作步骤请参照商品化 DNA 文库构建试剂盒说明书。文库片段范围以 250 ~ 500 bp 左右为主，总量不低于 250 ng。

2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#HC000	Probes (RNA 探针)	客户自备探针或 联系公司进行定制
WisGen#NC004	xLiBPreP™通用高保真文库 扩增试剂盒	用于捕获文库的 PCR 富集
WisGen#HC006	xCapSeq™ illumina 通用 封闭试剂	适用于 illumina 平台 TruSeq DNA 文库的 接头封闭
WisGen#MB003	xCapSeq™ T1 亲和磁珠	xCapSeq™ T1 亲和磁珠可 用 Dynabeads™ MyOne™ 链霉亲和素 T1 替代，若使 用其它品牌的链霉亲和素磁 珠请联系技术支持进行咨询

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#QC001	xQuant™ DNA 高灵敏定量试剂盒 (适配 Qubit®平台)	用于捕获产物的浓度测定
WisGen#MB002	xPure™分选磁珠	可用 Agencourt® AMPure XP Beads 代替
*	Nuclease-Free Water	/
*	无水乙醇	/

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可

3. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	PCR 基因扩增仪	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	恒温金属浴	/
*	移液器	/
*	荧光定量 PCR 仪	定量 PCR 仪和基于 荧光染料法
ThermoFisher# Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法的 DNA 定量系统的其 它同类产品
Eppendorf #5305000193	真空旋转蒸发仪	或其它同类产品
Agilent#G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品
WisGen#MR-B-16	xMag™磁力架 (1.5 mL*16 孔)	或其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
WisGen#MR-C-16	xMag™磁力架（0.2 mL*16 孔）	或其它同类产品
WisGen#QC001-R	xQuant™管（适配 Qubit®平台）	或其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™检测联管 (适配 Qubit®平台)	或其它同类产品
Axygen#PCR-02-C	0.2 mL 透明平盖 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的其它同类产品
Axygen#PCR-0208-C	0.2 mL 八连排透明 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的其它同类产品
Eppendorf#022431021	DNA LoBind Tube 1.5 mL	可选择低吸附、无核酸酶的其它同类产品
*	0.6 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶的产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶的产品
*	1000 μL 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	200 μL 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	0.5 - 10 μL 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可

实验流程

1.文库杂交封闭

1.1 试剂准备

xCap Universal Blocker: 从 -20 °C冰箱取出, 置于 4 °C融化。

xCap Human Cot I: 从 -20 °C冰箱取出, 置于 4 °C融化。

1.2 根据文库类型, 将下述试剂混合于 1.5 mL DNA LoBind 离心管中:

组分	质量或体积
DNA 投入量	500 ng *
● xCap Human Cot I	5 µg **
● xCap Universal Blocker	2 µL

⬆️ * 每个 DNA 文库的投入量均为 500 ng/文库, 复杂文库进行混合杂交时, 文库数量一般推荐 3~5 个, 简单文库文库进行混合杂交时, 建议文库数量不超过 12 个。过多的文库混合杂交会因文库数据量产出不均匀, 导致重复上机的概率增大。

⬆️ ** xCap Human Cot I 浓度为 1 µg/µL, 每个文库加入 5 µg 为最佳量。经测试, 若文库进行混合杂交时, xCap Human Cot I 可每 8 个文库 (共 4 µg) 加入量为 10 µg。

1.3 旋涡混匀上述封闭反应体系, 瞬时离心, 将所有组分收集到管底。

1.4 使用针头将管盖扎 3 ~ 5 个小孔, 将离心管置于真空旋转蒸发仪中, 55 °C真空旋转, 使反应液蒸发, 不宜过度干燥。

⚠️ 注意: 请勿干燥过度, 造成杂交捕获数据质量下降。

2. 文库杂交捕获

2.1 从 -20 °C 冰箱中取出以下试剂，在冰上融化：xCap 2× Hyb Buffer，xCap Enhancer Buffer。

！ 注意：若 xCap 2× Hyb Buffer 出现结晶，可提前放置室温，间隔振荡混匀，充分溶解再使用。其中 xCap Enhancer Buffer 切勿加热，以免失效。探针需充分融化混匀后进行使用。

2.2 向步骤 1.4 中已蒸干的 1.5 mL Lo-Bind EP 管中依次加入以下试剂：

组分	体积 (μL)
● xCap 2× Hyb Buffer	8
● xCap Enhancer Buffer	3
Nuclease-Free Water	1

2.3 用移液器吸打或涡旋振荡器振荡混匀，室温放置 10 min；再次吸打或振荡混匀，瞬时离心后，转移至 0.2 mL PCR 管中。

！ 注意：杂交反应多时，可转移至 0.2 mL 八联排 PCR 管。

2.4 立即放置于 PCR 仪中按照以下程序进行杂交实验，热盖温度 105 °C。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
步骤 1	95	5

！ 注意：结束后立即取出，快速加入探针振荡混匀继续杂交反应。

2.5 将 0.2 mL PCR 管取出后，迅速加入以下试剂：

组分	体积 (μL)
Biotin-RNA probe*	x
Nuclease-Free Water	4 - x

^ * 探针使用量根据具体探针使用需求而定，需提前配置好备用。

2.6 振荡混匀，瞬时离心后立即放置于 PCR 仪中 65 °C 进行杂交，热盖温度 75 °C。

步骤	温度 (°C)	时间 (h)
步骤 1	65	2 ~ 4

3. 准备洗脱液

3.1 在步骤 2 结束前 30 min，尽快进行步骤 3，根据后续的实验使用量，取

1 × WB II 在 PCR 仪上进行预热。

3.2 按下表所示，将各试剂 Buffer 稀释到 1× 的体系（1 个反应的量）。

！ 注意：各洗液提前放置于室温下完全溶解，无沉淀后，方可进行配制。

单个样本配制量方法			
Buffer 原液名称	Buffer 原液 (μL)	+Nuclease-Free Water (μL)	Total (μL)
○ xCap 4× Binding Buffer	160	480	640
○ xCap 10× WB I	21	189	210
○ xCap 10× WB II	63	567	630

！ 注意：xCap 10× WB I，xCap 10× WB II 会有沉淀，请于 65 °C 温浴完全溶解摇匀使用。

3.2.1 取杂交反应同等数量的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管），每管加入

200 μL 的 1× WB II，放在 65 °C PCR 仪预热 10 min 以上。

3.2.2 1× WB I 室温放置。

！ 注意：

1) 1× WB I 室温进行清洗，1× WB II 65°C 进行清洗，请注意区分。

2) 配制的 1× 体系可 -20 °C 冰箱内保存 30 天。

4. 准备链霉亲和素 T1 磁珠

4.1 准备磁珠

xCapSeq™ 链霉亲和素 T1 磁珠在使用前 30 min 准备即可，避免长时间室温放置。

同时需要达到室温之后，才能进行使用。提前配制 1× Binding Buffer 试剂，可按照步骤 3 的配制表进行。

4.2 从 4 °C 冰箱取出 xCapSeq™ 链霉亲和素 T1 磁珠后，室温放置 30 min。

4.3 涡旋振荡 15 sec，充分混匀。

4.4 按每个反应 50 μL，取 $50 * N$ μL xCapSeq™ 链霉亲和素 T1 磁珠，转入 1.5 mL 的离心管中。（N：代表文库数）

4.5 将离心管放置在 1.5 mL 磁力架上，等待磁珠与溶液彻底分离，用移液器小心去除上清，保留磁珠，注意不要吸到磁珠。

4.6 磁珠清洗：

4.6.1 按反应加 $200 * N$ μL 的 1× Binding Buffer，涡旋振荡 10 sec。

4.6.2 离心管转移至磁力架上，等待磁珠与溶液完全分离。

4.6.3 用移液器小心去除上清，保留磁珠，注意不要吸到磁珠。

4.7 重复上述步骤 4.6，共计三次。

4.8 将第三次的磁珠混合液按每个反应 200 μL 分装至新的 0.2 mL PCR（或八联排 PCR 管）中。

4.9 用磁力架吸附磁珠，去除上清保留磁珠，立即进行步骤 5，避免磁珠在空气中过度暴露。

5. 文库与链霉亲和素 T1 磁珠结合

5.1 将步骤 2.4 中在 65 °C 杂交的杂交液 16 μ L 全部转移至对应步骤 4.9 含磁珠的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中。

5.2 用移液器反复吸打溶液 10 次充分混匀或使用振荡器振荡混匀。

5.3 在 65 °C 杂交 PCR 仪器（热盖 75 °C）继续反应。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
步骤 1	65	45

5.4 每 10 ~ 12 min 取出振荡 5 sec，立即放入 PCR 仪器进行反应，直至满足总反应时间。

6. 洗脱未结合文库

6.1 WB I 清洗

6.1.1 向步骤 5.3 的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中，加入 200 μ L 1 \times WB I。

6.1.2 用移液器吸打 10 sec。

6.1.3 室温孵育 15 min，每间隔 5 min，振荡混匀，充分悬浮。

6.1.4 孵育结束后，将 PCR 管放置磁架 1 ~ 2 min，待液体清澈后，去除上清液

！ 注意：上清中含有大量未结合的 DNA，为防止气溶胶污染，请将上清弃于含 1% 次氯酸钠溶液的废液槽中。

6.2 WB II 清洗

6.2.1 将 PCR 管置于 65 $^{\circ}$ C PCR 仪中，加入 200 μ L 预热的 1 \times WB II，用移液枪吹打 10 ~ 15 次，充分悬浮。

6.2.2 进行 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min，每间隔 5 min，振荡混匀一次。

6.2.3 反应结束后放置磁架 1 ~ 2 min，待液体澄清后，去除上清液。

6.2.4 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离，去上清。

6.2.5 重复步骤 6.2.1 ~ 6.2.4 两次，共三次，其中最后一次将混匀的悬液转移至新 0.2 mL 离心管中（8 联排）。

6.3 重悬磁珠

6.3.1 将 PCR 管从磁力架上移开，立即加入 23.75 μ L Nuclease-Free Water。

6.3.2 涡旋混匀 10 sec 以上或者使用移液器反复吸打 10 次，保证所有磁珠重悬。

！ 注意：不要丢掉磁珠，含捕获 DNA 的 23.75 μ L 磁珠重悬液用于步骤 7.1 的 PCR 扩增。

7. 捕获文库 PCR 富集

7.1 根据文库类型，在 0.2 mL PCR 管中加入以下 PCR 反应体系：

组分	体积 (μL)
● 2×HiFi Master Mix*	25
● PCR Primer Mix (20 μM)*	1.25
磁珠重悬液 (步骤 6.3.2)	23.75
总量	50

⬆ * 2× HiFi Master Mix 及 PCR Primer Mix (20 μM) 为 xLiBPreP™通用高保真文库扩增试剂盒 (WisGen#NC004) 产品组分，需要单独购买。

7.2 短暂涡旋振荡混匀，轻甩或瞬时离心，保证磁珠仍悬浮于溶液中。

7.3 将 PCR 管放入 PCR 仪中，热盖温度 105 °C，按照如下程序进行 PCR 扩增：

步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	98	45 sec	1
变性	98	15 sec	12 *
退火	60	30 sec	
延伸	72	30 sec	
完全延伸	72	1 min	1
Hold	4	∞	1

⬆ * 循环数具体循环数可参考下表：

Panel 探针数目	单杂/ 500 ng 文库	双杂/ 1.0 μg 文库	4 杂/ 2.0 μg 文库	8 杂/ 4.0 μg 文库
500 以下	15	14	13	12
500~2500	14	13	12	11
2500~20000	13	12	11	10
20000~100000	12	11	10	9
Exon 级别	11	10	9	8

8. PCR 产物纯化

！ 注意：提前配制 80%乙醇，每个反应用 125 μ L。建议使用现配的 80%乙醇。纯化磁珠需提前室温放置 30 min，混匀使用。

8.1 向 PCR 反应产物中加 75 μ L xPure™分选磁珠，涡旋混匀，室温静置 5 min。

8.2 将 PCR 管置于磁力架上，等待磁珠与溶液完全分离，使用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

8.3 加入 125 μ L 现配的 80%乙醇，在磁力架上静置 30 sec，不要吹散磁珠。

8.4 当溶液完全澄清后，用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

8.5 去除上清后，可将 PCR 管放于瞬时离心机上离心 10 sec，在磁力架上放置 30 sec，用移液器将上完全去除，室温晾干 30 ~ 60 sec，待乙醇完全挥发，磁珠界面成磨砂状，无明显水珠，即可进行下面步骤。

！ 注意：请勿过度干燥磁珠，造成磁珠龟裂，影响洗脱效率。

8.6 加入 30 μ L 0.1 \times TE Buffer，使用移液器充分悬浮磁珠，并静置 5 min 洗脱 DNA。

8.7 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离。

8.8 转移洗脱后的文库于新的 PCR 管中。该文库用于质检或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

9. 捕获文库质检

9.1 最终的捕获文库使用 Qubit® 荧光定量仪进行定量，记录浓度，计算总量；建议使用 Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system 或其它同类产品对文库大小及峰型进行质检，通过荧光定量 PCR 对捕获文库进行定量，计算摩尔浓度。

9.2 文库质控参考标准：文库 Qubit® 荧光定量仪定量浓度不低于 1 ng/ μ L；文库片段大小在 200 ~ 500 bp 之间；荧光定量 PCR 仪定量浓度不低于 5 nM，熔解曲线峰型单一，无 Dimer 污染。

9.3 质检通过后可安排上机测序或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

欣基（杭州）生物科技有限公司

WisGen BioSciences Co., Ltd

Add：浙江省杭州市钱塘区福成路 400 号 6 幢 8 层

Service：order@wisgen.cn Web：www.wisgen.cn

