

xCapSeq™ DNA 杂交&清洗试剂盒

操作说明书

(Cat#HC001,Version4.4)

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 DNA	13
7. 捕获文库 PCR 富集	14
8. PCR 产物纯化	15
9. 捕获文库质检	16
附录	17

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。该系统使用高效合成的 120 nt DNA 探针，每条探针具有 Biotin 标记。该探针稳定性极强，每条探针均采用独立合成技术，可大幅度提升杂交捕获的质量及稳定性。

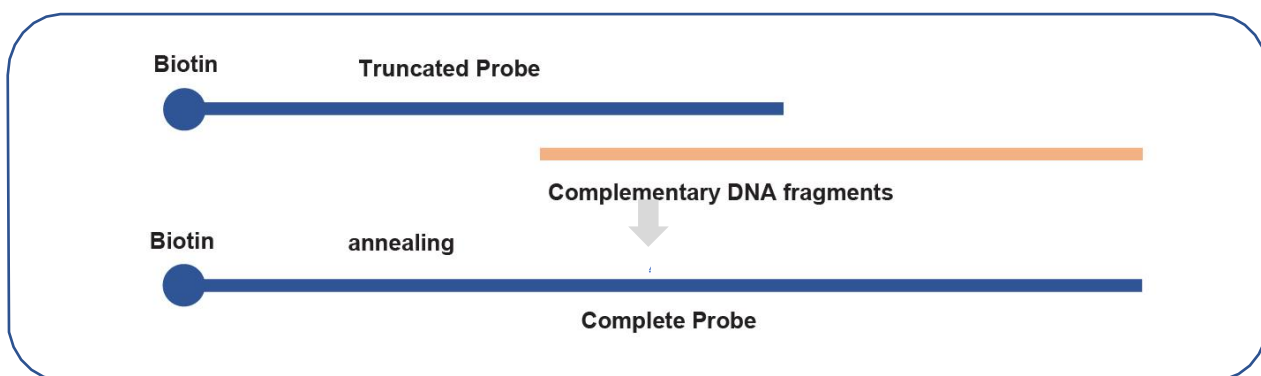


图 1. xCapSeq™ 探针合成示意图

xCapSeq™ DNA 杂交&清洗试剂盒是专门针对 xCapSeq™ 靶向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。

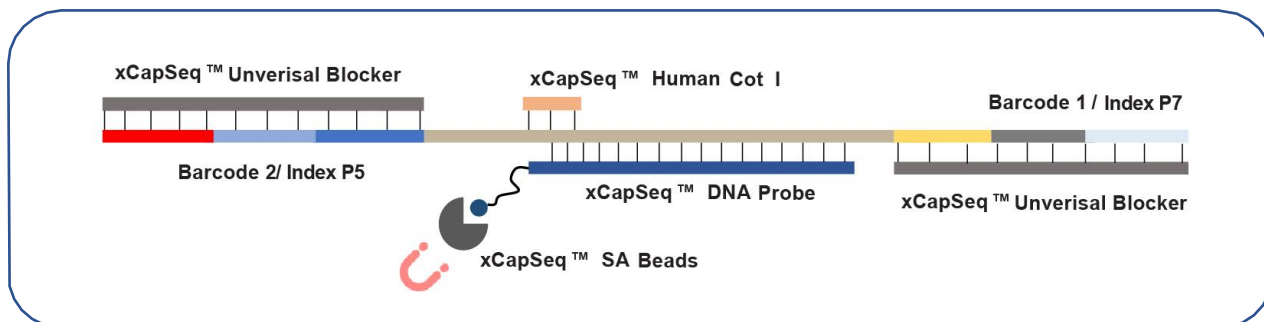


图 2. xCapSeq™ 探针杂交捕获原理图

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

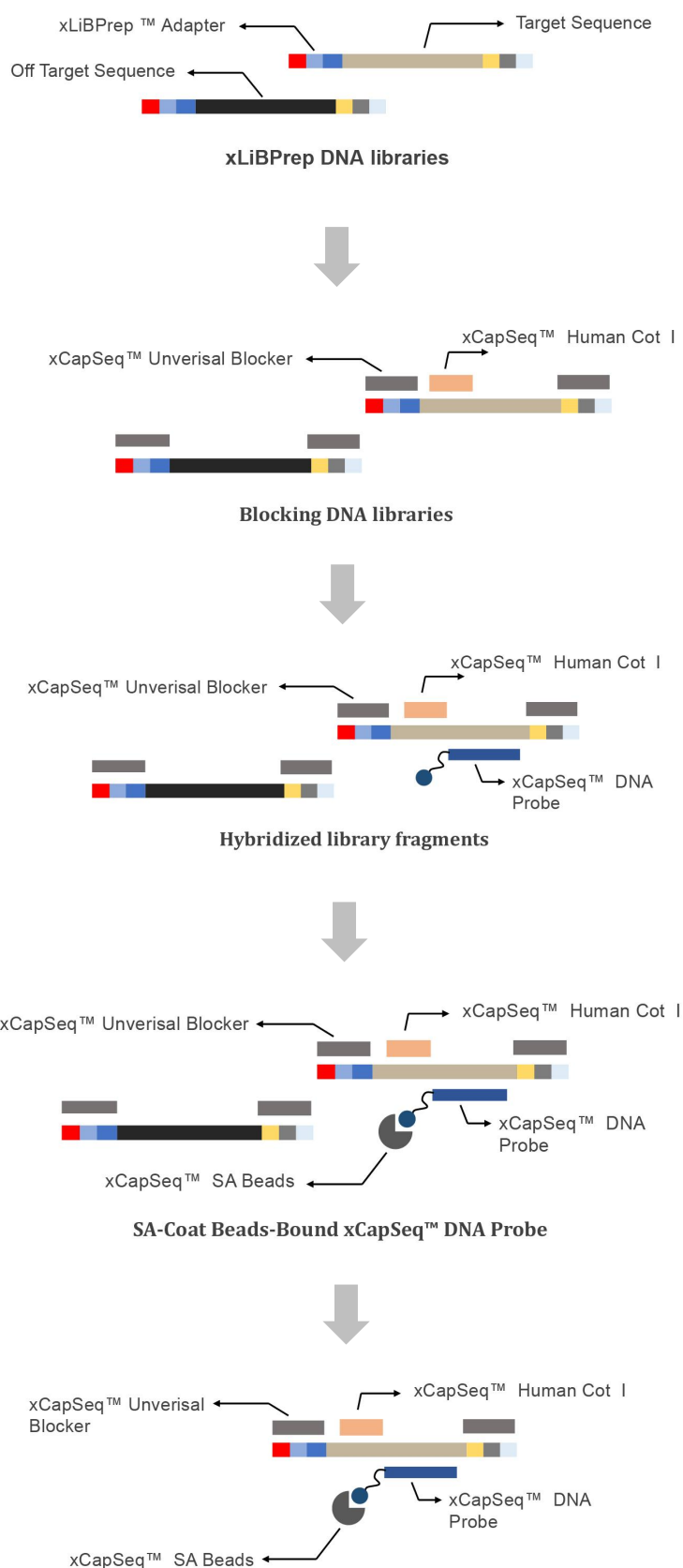


图 3. xCapSeq™ 液相捕获实验流程图

产品组成

主货号：HC001 规格：12 rxns / 96 rxns

产品组分	12 rxns (HC001-012)	96 rxns (HC001-096)
● xCap 2× Hyb Buffer	96 μL	768 μL
● xCap Enhancer Buffer	36 μL	288 μL
● xCap Human Cot I	60 μL	480 μL
○ xCap 10× SW	384 μL	3072 μL
○ xCap 5× WB I	648 μL	5184 μL
○ xCap 10× WB II	192 μL	1536 μL
○ xCap 10× WBIII	192 μL	1536 μL
○ xCap 2× BWB	1920 μL	15.36 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 DNA 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. 使用 1× WB I 热洗时，务必加快实验操作，保证在 10 sec 内完成。不可洗涤时间过久，造成捕获均一性下降；也不可洗涤时间过短，造成非特异性文库过多。
8. 1× SW 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，不可少于 2.5 min，也不可多于 2.5 min，温度务必维持在 65 °C，利于非特异性文库从磁珠上脱离，建议在 65 °C 的 PCR 仪上进行。
9. 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 250~400 bp 左右为主，总量不低于 500 ng。

2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#HC000	Probes (DNA 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#MB001	xCapSeq™ 亲和磁珠	xCapSeq™ 亲和磁珠可用 Dynabeads™ M-270 Streptavidin 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
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

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
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
WisGen#MR-C-16	xMag™ 磁力架 (0.2 mL*16 孔)	或其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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 µL
● 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。

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，Probe。

！ 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	3
Probe*	2

⬆ * 不同 Panel，单反应探针加入体积不同，体积变化不影响杂交效果，但加入探针后，杂交反应总体积建议不超过 20 μL。探针体积增加，杂交体系中无核酶水体积可以相应减少。

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
步骤 2	65	>120 min *

⬆ * 热循环 2 h 即可达到常规杂交捕获的实验要求，延长至 4 h 可以提高杂交捕获的效果，超过 4 h 对于效果的提升不显著。客户可以根据实际的时间调整对应的杂交捕获反应时间，也可以根据需求过夜杂交。

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，取部分 Buffer 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 2× BWB	160	160	320
○ xCap 10× SW	32	288	320
○ xCap 5× WB I	54	216	270
○ xCap 10× WB II	16	144	160
○ xCap 10× WBIII	16	144	160

！ 注意：

- 1) xCap 10× SW、xCap 5× WB I，xCap 10× WB II 会有沉淀，请于 65 °C 温浴完全溶解摇匀使用。
- 2) 如有质量较差的 FFPE 样本，文库构建明显偏短，xCap 10× SW 可以稀释 5 倍用，即 2× 浓度使用，会提高较差样本的文库的均一性，但会使得捕获效率有所降低。

3.2.1 将 1× SW 和 1× WB I，放在 65 °C PCR 仪 10 min 以上。

1× SW：2 次用量。取杂交反应 2 倍数量的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管），每管加入 160 μL，置于 65 °C PCR 仪。

1× WB I：1 次用量。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 110 μL，置于 65 °C PCR 仪。

3.2.2 室温放置

1× WB I：上述表配制的；160 μL/rxn，20~30 °C放置。

1× WB II：上述表配制的；160 μL/rxn，20~30 °C放置。

1× WBIII：上述表配制的；160 μL/rxn，20~30 °C放置。

! 注意：

1) 1× WB I 需要两个温度放置，分别为 65 °C和 20~30 °C，请注意区分。

2) 配制的 1× 体系可 -20 °C冰箱内保存 30 天。

4. 准备链霉亲和素磁珠

4.1 准备磁珠

xCapSeq™ 亲和磁珠在使用前 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× BWB 试剂，可按照步骤 3 的配制表进行。

4.2 从 4 °C冰箱取出 xCapSeq™ 亲和磁珠后，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™ 亲和磁珠，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 100 * N μL 的 1× BWB，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 100 μ L 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 DNA

6.1 准备 65 °C洗脱

6.1.1 在 65 °C PCR 仪向步骤 5.3 的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中，加入 100 μ L 65 °C预热的 1 \times WB I。

6.1.2 用移液器吸打 10 sec。

! 注意：为了防止预热的 1 \times WB I 失温，该操作需在 PCR 仪中进行。

6.1.3 将离心管放在磁力架上，磁珠与溶液完全分离，尽快去上清。

! 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。

6.1.4 使用 1 \times SW 清洗磁珠。

6.1.4.1 将 PCR 管放置于 65 °C PCR 仪上，立即加入 150 μ L 65 °C预热的 1 \times SW。

6.1.4.2 用移液器吸打混匀 10 sec，进行温浴并准确定时：65 °C，2.5 min。

6.1.4.3 将 PCR 管放置于磁力架上，待上清澄清后，用移液器迅速去上清。

6.1.4.4 重复步骤 6.1.4 一次，1 \times SW 总共清洗磁珠两次。

6.2 准备室温洗脱

6.2.1 向 PCR 管中，加入 150 μ L 室温放置的 1 \times WB I，用移液枪吹打 10~15 次，充分悬浮。

6.2.2 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离，去上清。

6.2.3 向 PCR 管中，加入 150 μ L 室温放置的 1 \times WB II，用移液枪吹打 10~15 次，充分悬浮。

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 向 PCR 管中，加入 150 μ L 室温放置的 1 \times WBIII，用移液枪吹打 10~15 次，充分悬浮磁珠。

6.2.6 将步骤 6.2.5 的混匀悬液吸至新 0.2 mL PCR 管中，置于磁力架上，使磁珠与溶液完全分离，去上清。

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 (μ L)
● 2 \times HiFi Master Mix*	25
● PCR Primer Mix (20 μ M)*	1.25
磁珠重悬液 (步骤 6.3.2)	23.75
总量	50

！ * 2 \times HiFi Master Mix 及 PCR Primer Mix(20 μ M)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。

！ 注意：此体系适用于 illumina 体系，其他测序平台请联系技术支持。

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	10	9	8	7

8. PCR 产物纯化

! 注意：提前配制 80%乙醇，每个反应用 125 µL。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 µL 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 µL 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。

附录

xPure™ 分选磁珠浓缩文库方案

！ 注意：此方案需要使用 10 μ L xCap Human Cot I，可咨询@wisgen.cn 单独购买。

1. 每个 DNA 文库的投入量均为 500 ng 文库，简单文库文库进行混合杂交时，建议文库数量不超过 12 个。

！ 注意：样本 pool 后体积较大，建议使用 1.5 mL Lo-Bind EP 管。

1. 加入 10 μ L xCap Human Cot I。
2. 加入 2x 体系的 xPure™ 分选磁珠。
3. 充分振荡混匀后，室温静置 10min。
4. 将 EP 管置于磁力架上 2min，至管中溶液澄清。
5. 弃去上清液，保持 EP 管在磁力架上，加入 80%乙醇至超过磁珠，静置 30s 后弃去上清液。
6. 取下 EP 管，瞬时离心后置于磁力架，完全去除乙醇后晾干 2min，避免过度干燥。
7. 按照以下体系，加入杂交反应试剂：

Hybridization Reaction Mix	Volume
xCap 2 \times Hyb Buffer	8 μ L
xCap Enhancer Buffer	3 μ L
xCapSeq Universal Blocker	2 μ L
Probe*	x μ L
Nuclease-Free Water	4-x μ L

！ 注意：杂交反应液可从磁珠上将文库洗脱。

8. 充分振荡混匀，室温静置 5min。
9. 将 EP 管置于磁力架 2min，确保磁珠完全吸附。
10. 转移 16 μ L 反应液至杂交反应管中，进行或许杂交捕获实验。

！ 注意：避免转移时吸到磁珠。

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城路 400 号 6 幢 8 层

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

