

xCapSeq™ DNA 杂交&清洗 Ultra 试剂盒 操作说明书

(Cat#HC015,Version5.0)

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. 文库杂交捕获	8
2. 准备洗脱液	10
3. 文库与链霉亲和素磁珠结合	11
4. 洗脱未结合 DNA	12
5. 捕获文库 PCR 富集	13
6. PCR 产物纯化	14
7. 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。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。

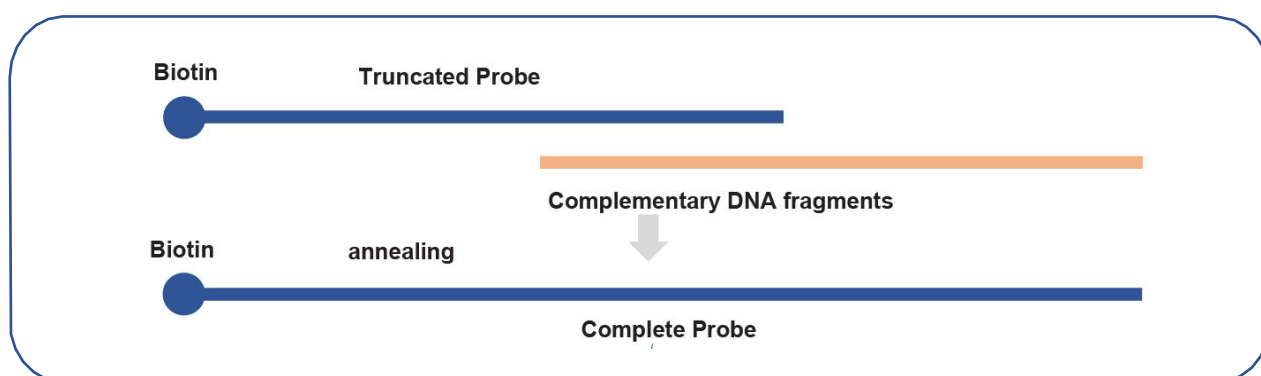


图 1. xCapSeq™ 探针合成示意图

xCapSeq™ DNA 杂交&清洗 Ultra 试剂盒是专门针对 xCapSeq™ 靶向捕获系列产品开发的最新版本试剂盒。通过放大杂交体系实现文库免蒸干；杂交时间缩短至 0.5h，极致情况可实现 15min 杂交；非特异性洗脱流程仅需一个试剂，且 6 分钟即可完成。同时结合 xCapSeq SA 磁珠的免洗工艺，可满足极速高效的交付需求。

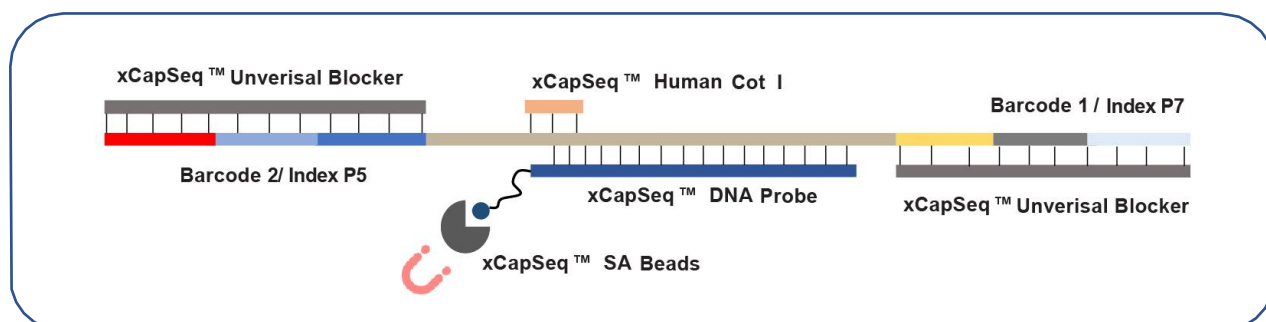


图 2. xCapSeq™ 探针杂交捕获原理图

实验流程

添加 xCapSeq™ Ultra Blocker

探针杂交

亲和磁珠孵育

非特异性捕获洗脱

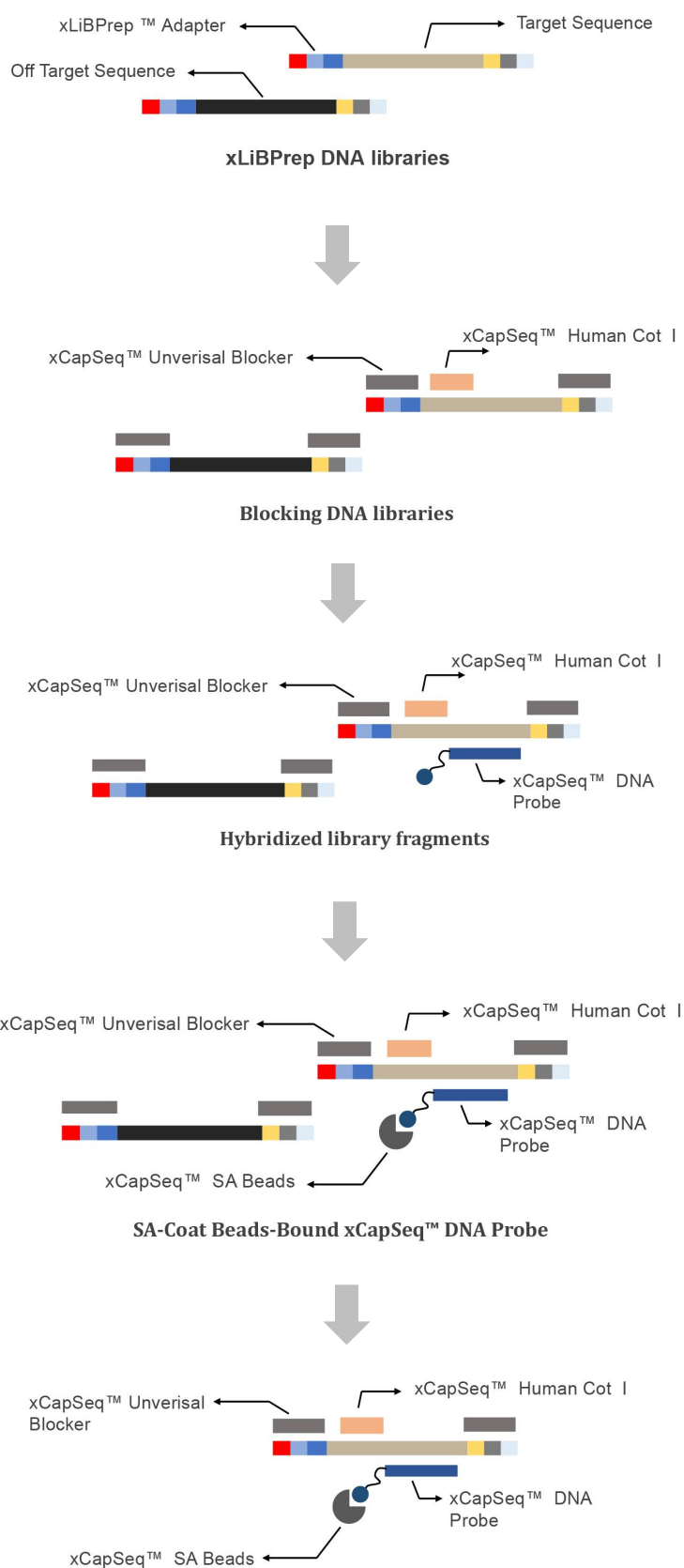


图 3. xCapSeq™ 液相捕获实验流程图

产品组成

主货号：HC015 规格：12 rxns / 96 rxns

产品组分	12 rxns (HC015-012)	96 rxns (HC015-096)
● xCap Ultra Hyb Buffer	180 μ L	1440 μ L
● xCap Ultra Enhancer	60 μ L	480 μ L
● xCap Ultra Blocker	24 μ L	192 μ L
○ xCap 10 \times WB	576 μ L	4608 μ L
○ xCap 2 \times EB	960 μ L	7680 μ L

保存与运输条件

-30~-15 $^{\circ}$ C保存， ≤ 0 $^{\circ}$ 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。
5. 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。
6. $1\times$ WB 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 min，也不可多于 2 min，温度务必维持在 68 °C，利于非特异性文库从磁珠上脱离，建议在 68 °C 的 PCR 仪上进行。
7. 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 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#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
WisGen#MB002	xPure™ 分选磁珠	可用 Agencourt® AMPure XP Beads 代替

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
*	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
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
WisGen#QC001-R	xQuant™ 管 (适配 Qubit®平台)	或其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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.文库杂交捕获

1.1 试剂准备

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

xCap Ultra Hyb Buffer, xCap Ultra Enhancer, Probe。

! 注意: xCap Ultra Hyb Buffer 解冻后存在结晶, 需 65 °C加热充分混匀溶液呈现乳浊状态下, 保持 65°C热浴时使用。其中 xCap Ultra Enhancer Buffer 切勿加热, 以免失效。探针需充分融化混匀后进行使用。

1.2 根据文库类型, 将下述试剂混合于 0.2 mL PCR 管中:

组分	体积
DNA 投入量	x μ L *
● xCap Ultra Blocker*	2 μ L
● xCap Ultra Hyb Buffer	15 μ L
● xCap Ultra Enhancer	5 μ L
Probe*	2 μ L
Nuclease-Free Water	11-x μ L

^ * 每个 DNA 文库的投入量一般为 500 ng/文库, 多文库进行混合杂交时, 可适当减少每个样本投入量, 最少每个样本 120ng, 文库数量一般推荐 2-4 个。

^ * xCap Ultra Blocker 中包含 Unverisal Blocker 和 Human Cot I 两种组分, 因此使用前需要确认文库构建时的接头使用类型。


^ * 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, 杂交反应总体积不超过 35 μ L。探针体积增加, 杂交体系中无核酶水体积可以相应减少。

1.3 用移液器吸打或涡旋振荡器振荡混匀, 瞬时离心。

! 注意: 杂交反应多时, 可转移至 0.2 mL 八联排 PCR 管。

1.4 将反应管放置于 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	68	>30 *

 * 热循环 0.5h 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。

2. 准备洗脱液

2.1 在步骤 1 结束前，尽快进行步骤 2，根据后续的实验使用量，取部分 Buffer 在 PCR 仪上进行预热。

2.2 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：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 10× WB	48	432	480
○ xCap 2× EB	80	80	160

! 注意：xCap 10× WB 会有沉淀，请于 68 °C 温浴完全溶解摇匀使用。

2.2.1 将 1× WB，放在 68 °C PCR 仪 10 min 以上。

1× WB：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 68 °C PCR 仪。

2.2.2 室温放置

1× WB：上述表配制的；160 μL/rxn，20~30 °C 放置。

1× EB：上述表配制的；160 μL/rxn，20~30 °C 放置。

! 注意：

1) 1× WB 需要两个温度放置，分别为 68 °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。

3. 文库与链霉亲和素磁珠结合

3.1 从 4 °C 冰箱取出 xCapSeq™ 亲和磁珠后，室温放置 30 min。

3.2 涡旋振荡 15 sec，充分混匀。

3.3 按每个反应 50 μL，分装至新的 0.2 mL PCR（或八联排 PCR 管）中。

3.4 用磁力架吸附磁珠，去除上清保留磁珠，立即进行下一步骤，避免磁珠在空气中过度暴露。

3.5 将步骤 2.4 中在 68 °C 杂交的杂交液 35 μL 全部转移至上一步骤含磁珠的对应 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中。

3.6 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。

3.7 在 68 °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	68	45

3.8 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。

4. 洗脱未结合 DNA

4.1 准备 68 °C洗脱

4.1.1 在 68 °C PCR 仪向步骤 4.8 的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中，加入 150 μ L 68 °C预热的 1 \times WB。

4.1.2 用移液器吸打 10 sec，进行温浴并准确定时：68 °C，2 min。

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

4.1.3 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。

4.1.4 将 PCR 管放置于 68 °C PCR 仪上，立即加入 150 μ L 68 °C预热的 1 \times WB，总共清洗磁珠两次。

4.1.5 用移液器吸打混匀 10 sec，进行温浴并准确定时：68 °C，2 min。

4.1.6 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。

4.2 准备室温洗脱

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

4.2.2 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离，去上清。

4.2.3 向 PCR 管，加入 150 μ L 室温放置的 1 \times EB，移液枪吹打 10~15 次，充分悬浮。

4.2.4 将上一步骤的混匀悬液吸至新 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。

4.3 重悬磁珠

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

4.3.2 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 5.1 的 PCR 扩增。

5. 捕获文库 PCR 富集

5.1 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 4.3.2)	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。

5.2 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。

5.3 将 PCR 管放入 PCR 仪中，热盖温度 105 $^{\circ}$ C，按照如下程序进行 PCR 扩增：

步骤	温度 ($^{\circ}$ 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	500 ng 文库	1.0 µg 文库
500 以下	15	14
500~2500	14	13
2500~20000	13	12
20000~100000	12	11
Exon 级别	10	9

6. 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。

6.1 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。

6.2 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。

6.3 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。

6.4 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。

6.5 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。

6.6 加入 30 µL 0.1× TE Buffer，使用移液器充分悬浮磁珠，并静置 5 min 洗脱 DNA。

6.7 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离。

6.8 转移洗脱后的文库于新的 PCR 管中。该文库用于质检或 -20 °C 保存。

7. 捕获文库质检

7.1 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。

7.2 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/μL；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。

7.3 质检通过后可安排上机测序或 -20 °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城路 400 号 6 幢 8 层

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

