

仅供研究使用，不可用于临床诊断
适用于 Illumina 和 MGI 测序平台
应用广泛，可进行探针定制

如有问题，请联系：

🌐 www.igenetech.com/support

📞 010-89146623

✉ support@igenetech.com

TargetSeq One[®] Hyb & Wash Kit

两轮捕获解决方案

适用于 2022 年新产品体系

版本号：B.0，2022 年 6 月

文档号：PROT220617

样本提取

文库制备

靶向捕获

上机测序

数据分析

版本说明

生产公司：艾吉泰康（嘉兴）生物科技有限公司

使用说明

本说明书适用于 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit，针对目标基因组进行两轮捕获。使用前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书内容进行实验。

试剂盒概述

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit 两轮捕获解决方案，是针对目标基因组进行两轮液相探针杂交捕获的方案，适用于 Illumina 和 MGI 高通量测序平台。在含有目标基因组的样本中，目标基因组拷贝数是不固定的，对于目标基因组拷贝数极低的样本，可以对文库进行两轮杂交捕获，进一步提升目标基因组的富集效率。艾吉泰康基于多因素算法对基因组目标区域进行探针设计，合成生物素标记的特异性捕获探针，本试剂盒可以对目标序列进行捕获富集，提升捕获性能的同时也极大地降低了测序数据量。

更新信息

使用说明书名称	修订日期	修订内容摘要
B.0	2022 年 6 月	修改适配新产品体系
V1 (218012)	2021 年 8 月	首次发布

试剂盒组成

用于杂交捕获的试剂包括 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit, TargetSeq® Blocking Oligo, TargetSeq® Target Probes 和 TargetSeq® Cap Beads。

! TargetSeq One® Hyb & Wash Kit 和 TargetSeq® Blocking Oligo 与文库类型有关。请根据文库类型选择正确的版本。

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit 有针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本。TargetSeq One® Hyb & Wash Kit 包含以下三个不同的模块。

产品名称	组成	储存温度
TargetSeq One® Hyb & Wash Kit *	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module A)	-20°C ± 5°C
	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module B)	15°C ~ 25°C
	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C)	-20°C ± 5°C

*TargetSeq One® Hyb & Wash Kit 有针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本, 与 Module C 一致, 分别为 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C, for Illumina), TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C, for MGI SI) 和 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C, for MGI DI)。

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module A)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
紫色	Hyb Human Block	88 µL	540 µL	-20°C ± 5°C
紫色	RNase Block	88 µL	540 µL	
紫色	TargetSeq One® Hyb Buffer	360 µL	2*1080 µL	

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module B)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
瓶装	Binding Buffer	14 mL	84 mL	15°C ~ 25°C
瓶装	TargetSeq One® Wash Buffer	18 mL	108 mL	
瓶装	Wash Buffer 1	4 mL	24 mL	

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
橙色	Post PCR Master Mix	450 µL	2*1350 µL	-20°C ± 5°C
橙色	Post PCR Primer (25 µM)*	32 µL	192 µL	

*Post PCR Primer (25 µM) 有针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本, 与 Module C 版本相对应。

TargetSeq® Blocking Oligo

iGeneTech 提供两种 TargetSeq® Blocking Oligo 可供选择。TargetSeq® Universal Blocking Oligo 与 TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo 封闭文库的上限分别为 6 µg 和 3 µg。同时, TargetSeq® Blocking Oligo 也包括针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本。

请根据混合杂交方式和文库类型选择合适的 Blocking Oligo。

TargetSeq® Universal Blocking Oligo

管盖颜色	组分	总量			储存温度
		4 rxn	16 rxn	96 rxn	
紫色	TargetSeq® Universal Blocking Oligo	10 µL	36 µL	200 µL	-20°C ± 5°C

TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
紫色	TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo	36 µL	200 µL	-20°C ± 5°C

TargetSeq® Target Probes

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
红色	TargetSeq® Target Probes*	36 µL	216 µL	<-70°C

TargetSeq® Cap Beads & Nuclease-Free Water

管盖颜色	组分	总量			储存温度
		1000 µL each	5 mL each	50 mL each	
绿色或瓶装	TargetSeq® Cap Beads*	1000 µL	5 mL	50 mL	2 ~ 8°C
白色或瓶装	Nuclease-Free Water	1000 µL	5 mL	50 mL	

*TargetSeq® Cap Beads 是用于杂交捕获的链霉亲和素磁珠, 与 IGT™ Pure Beads 不同。Thermo Fisher 公司提供的 Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 (货号 65602) 可作为 TargetSeq® Cap Beads 的替代产品。

自备的试剂、仪器和耗材



以下为艾吉泰康推荐品牌，也可使用已有满足实验要求的替代试剂和耗材。

自备试剂

序号	试剂名称	推荐试剂	推荐品牌和货号
1	无水乙醇	无水乙醇	北京化工分析纯
2	Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	Ambion (Cat # AM9930)
3	纯化磁珠（任选一种使用）	Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (Cat # A63880)
		IGT™ Pure Beads	iGeneTech (Cat # C80661)
4	文库片段质检试剂（请根据仪器选择对应的试剂盒使用）	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent (Cat # 5067-1504)
		S2 Cartridge (Standard Cartridge)	BiOptic (Cat # C105101)
5	Qubit 定量试剂	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (Cat # C47257)

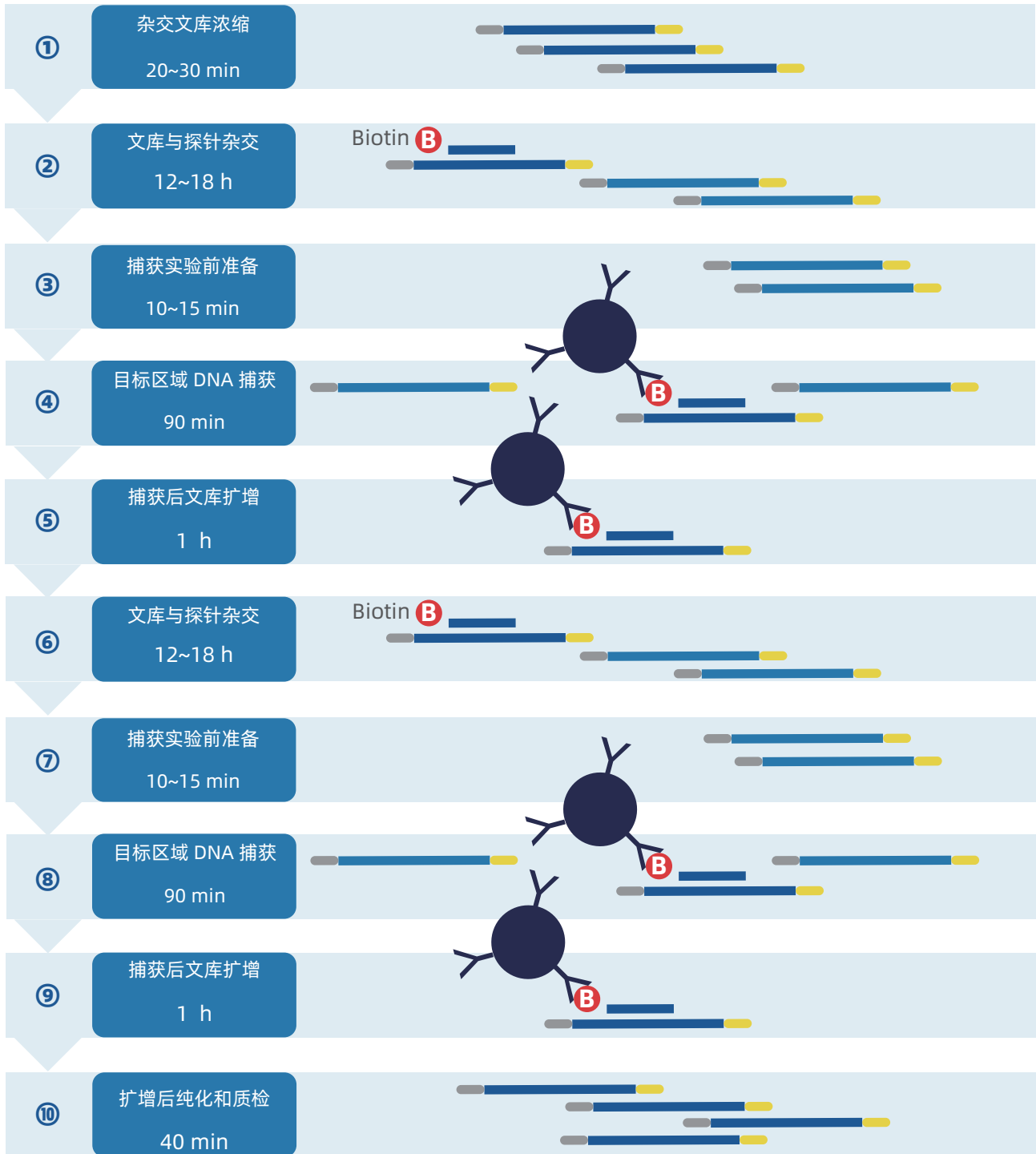
自备仪器

序号	仪器名称	推荐仪器	推荐品牌和货号
1	真空离心浓缩仪	SPD2010 Integrated SpeedVac	Thermo Fisher (Cat # SPD2010-220)
2	片段分析仪 (任选一种使用)	Agilent 2100 Bioanalyzer system	Agilent (Cat # G2939AA)
		Qsep100	BiOptic (Cat # Qsep 100)
3	金属浴 (0.2 mL)	市面主流品牌	市面主流品牌
4	垂直旋转混匀仪 (0.2 mL)	市面主流品牌	市面主流品牌
5	Qubit 荧光计	Qubit 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Cat # Q33226)
6	0.2 mL PCR 管磁力架	DynaMag -96 Side	Thermo Fisher (Cat # 12331D)
7	PCR 仪	市面主流品牌	市面主流品牌
8	涡旋振荡混匀仪	市面主流品牌	市面主流品牌
9	水浴锅	市面主流品牌	市面主流品牌
10	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
11	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌

自备耗材

序号	耗材名称	推荐耗材	推荐品牌和货号
1	0.6 mL 离心管	0.6 mL MaxyClear Snaplock Microcentrifuge Tube	Axygen (Cat # MCT-060-C)
2	0.2 mL 离心管	市面主流品牌	市面主流品牌
3	0.2 mL 八连管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	10 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌
5	200 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌

工作原理及流程图



使用前说明

欢迎使用 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit，在使用前请确认以下几点：

- 加样必须使用 RNase-free 的耗材和器械，最好可以对环境进行核酸酶灭活。
- 杂交捕获前文库经过质检，并且是合格预文库。
- 此方案需要做两轮杂交捕获，请合理安排时间。
- 请确定使用的接头封阻序列与预文库使用的接头是匹配的。
- 请确定使用的 Post PCR Primer 与预文库是匹配的。
- 此方案是针对目标基因组进行两轮捕获的解决方案。
- 此方案包含两轮杂交捕获实验，需要使用双倍试剂，请提前准备。

如果以上均满足，即可以开始实验

STEP 1 杂交捕获实验前期准备

实验备注区

本实验约需要做两轮液相探针杂交捕获实验，请合理安排实验时间。

- 1.1 将 Hyb Human Block、RNase Block 从 -20°C 的冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上暂存；
- 1.2 将配套的 TargetSeq® Blocking Oligo 从 -20°C 的冰箱中取出，置于冰盒上融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上暂存；
- 1.3 将需要用到的探针从 -80°C 冰箱取出，置于冰盒上融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上暂存；
- 1.4 将要进行杂交捕获的文库从 -20°C 的冰箱中取出，置于冰盒上融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上暂存；
- 1.5 将 TargetSeq One® Hyb Buffer 取出，室温融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，如有沉淀，需要将 TargetSeq One® Hyb Buffer 置于 37°C 水浴锅中加热，待试剂完全溶解后再使用。

STEP 2 文库与探针杂交

实验备注区

下列步骤采用真空浓缩方案，如果实验室不具备真空浓缩的条件时，可选磁珠浓缩和文库与探针杂交法，具体步骤详见附录一。



对于目标基因组的捕获，请谨慎采用多杂操作。由于目标基因组拷贝数是不固定的，在进行多杂操作时，数据产出和病毒拷贝数相关，对于病毒拷贝数很少的样本，可能会导致该文库测序数据产出极少。

2.1 取 750 ng 文库加入 PCR 管中，做好标记。多个文库混合杂交时，每个文库加入 500 ng。



请注意文库投入总量，需要根据文库投入总量选配一种合适的 Universal Blocker 进行杂交反应：

- TargetSeq® Universal Blocking Oligo Kit 可以封闭 6 μg 以内的文库。
- TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo Kit 可以封闭 3 μg 以内的文库。

2.2 将 PCR 管放入真空浓缩离心机，打开 PCR 管盖，浓缩至干燥状态（若实验室不具备真空浓缩的条件时，可选磁珠法浓缩，具体步骤详见附录一）。



浓缩之前可以先用相同体积的水进行浓缩时间测试，估算浓缩所需时间，避免因浓缩时间过长导致过度干燥，造成样本损失。

2.3 文库浓缩完成后，按下表配制杂交反应液：

试剂	体积
TargetSeq One® Hyb Buffer	13 μL
Hyb Human Block	5 μL
TargetSeq® Blocking Oligo	2 μL
RNase Block	5 μL
Nuclease-Free Water	3 μL
TargetSeq® Target Probes	2 μL
总体积	30 μL



杂交反应液配制时，最后加入探针，或者在RNase Block 加入后再加入探针，因为RNase Block 可以保护探针。

2.4 将杂交反应液加入到干燥的文库中，涡旋振荡 30 s 以确保干燥在管底的 DNA 溶解，并短暂离心。

2.5 设置 PCR 仪参数如下，将杂交反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	热盖温度 85°C
80°C	5 min
50°C	Hold

2.6 建议杂交时间为 16~24 h，程序结束前 30 min 进行 STEP 3。

STEP 3 捕获实验前准备

实验备注区

- 3.1 提前将 Cap Beads 从 4°C 冰箱中取出，充分混匀并置于室温平衡 30 min。
- 3.2 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇，置于室温条件下暂存，在纯化步骤中使用。
- 3.3 将 Wash Buffer 1 取出，如果有沉淀析出，请将 Wash Buffer 1 置于 37°C 水浴锅中加热，待沉淀完全溶解后再使用。
- 3.4 将 TargetSeq One® Wash Buffer 取出，置于 50°C 的水浴锅上预热。
- 3.5 取 50 μL Cap Beads 加入新的 PCR 管内，置于磁力架上 1 min，待溶液澄清，移弃上清。



捕获所用磁珠需采用 Cap Beads，不建议使用其他型号的磁珠如 C1、M270、M280 等替代，一定不要错用成纯化磁珠！

- 3.6 从磁力架上取下 PCR 管，加入 180 μL 的 Binding Buffer 吸打或涡旋振荡混匀，以重悬磁珠。
- 3.7 瞬时离心后将 PCR 管置于磁力架上 1 min，待溶液澄清，移弃上清；
- 3.8 重复步骤 3.6~3.7 两次，共使用 Binding Buffer 清洗磁珠三次；
- 3.9 从磁力架上取下 PCR 管，加入 180 μL Binding Buffer 吸打或涡旋混匀，立即进行 STEP 4。

STEP 4 目标区域 DNA 捕获

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Wash Buffer 1
- TargetSeq One® Wash Buffer (50°C 预热)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water
- Cap Beads (清洗后重悬在 Binding Buffer 中)

需要使用到的仪器：

- 垂直旋转混匀仪
- 恒温振荡混匀仪或金属浴
- 磁力架

- 4.1 保持 STEP 2 的杂交产物在 PCR 仪上，将 STEP 3 准备好的 180 μ L Cap Beads 加入到杂交产物中，吸打混匀。
- 4.2 盖好管盖，将 PCR 管从 PCR 仪上取下，置于垂直旋转混匀仪上，转速不超过 10 rpm，室温结合 30 min (如果实验室无垂直旋转混匀仪，可以在室温下结合 30 min，期间每隔 5 min 上下颠倒数次混匀)。
- 4.3 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 4.4 从磁力架上取下 PCR 管，向 PCR 管内加入 150 μ L 的 Wash Buffer 1 轻轻吸打混匀，以重悬磁珠，更换新的管盖，然后置于垂直旋转混匀仪上室温清洗 15 min，转速不超过 10 rpm。
- 4.5 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 4.6 从磁力架上取下 PCR 管，加入 150 μ L 50°C 预热的 TargetSeq One® Wash Buffer，轻轻吸打混匀，瞬时离心，置于金属浴上，50°C 孵育 10 min。
- 4.7 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 4.8 重复步骤 4.6~4.7 两次，共使用 TargetSeq One® Wash Buffer 50°C 清洗磁珠三次。
- 4.9 保持 PCR 管在磁力架上，向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇，静置 30 s 后彻底移弃乙醇溶液 (可用 10 μ L 移液器移弃残留乙醇)，室温晾干磁珠使残留的乙醇完全挥发。
- 4.10 向 PCR 管加入 24 μ L Nuclease-Free Water，从磁力架上取下 PCR 管，短暂涡旋混匀重悬磁珠，进行 STEP 5 的扩增反应。



一定不要丢弃磁珠！捕获后的文库是结合在磁珠上的。

STEP 5 捕获后 PCR 扩增

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Post PCR Master Mix
- Post PCR Primer

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

5.1 提前将 Post PCR Master Mix、Post PCR Primer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后置于冰盒上暂存。

5.2 实验前请再次核对 Post PCR Primer 是否使用正确，短暂涡旋 Post PCR Master Mix、Post PCR Primer，瞬时离心。

5.3 按下表配制 PCR 反应液，注意，此步骤是带磁珠 PCR 反应：

试剂	体积
STEP 4 得到的磁珠悬液	24 μL
Post PCR Primer	1 μL
Post PCR Master Mix	25 μL
总体积	50 μL

5.4 配制完成后，使用移液器吸打混匀，混匀后快速转移到 PCR 仪上，请勿使用涡旋后离心的方法来混匀。

5.5 设置 PCR 仪程序如下，将 PCR 反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间		文库总投入量	Post-PCR 循环数
热盖温度 105℃				
95℃	1 min	N 个循环	750 ng	N
98℃	20 s		1.5 μg	N-1
60℃	30 s		3 μg	N-2
72℃	30 s		6 μg	N-3
72℃	5 min			
4℃	hold			



PCR 循环数请参考探针 Target Probe 管壁标签参数或探针说明文件，Post-PCR 循环数与杂交时文库总投入量相关，当杂交时文库投入量较多时，可适当降低 Post-PCR 的循环数。

因为 MGI 平台上机测序所需文库量较多，建议多加两个循环。

5.6 程序完成后，进行 STEP 6 的磁珠纯化。

此步骤为可暂停步骤，可在 -20℃ 下暂存一个月。

STEP 6 扩增后纯化

实验备注区

需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)
- 80% 乙醇 (新配制)

需要使用到的仪器：

- 磁力架

6.1 取出纯化磁珠，混匀并置于室温平衡 30 min。

! 纯化步骤使用磁珠为 IGT™ Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠比例，避免纯化失败。

6.2 在 STEP 5 的 PCR 产物中，加入 1.1 倍体积的磁珠 (55 μ L)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。

6.3 瞬时离心，并将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。

6.4 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s。

6.5 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s 后彻底移弃上清（可瞬时离心，将挂壁液体离心至管底，再使用 10 μ L 移液器移弃底部残留的乙醇溶液）。

6.6 保持 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5 min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。

! 纯化结束，立刻进入下一步操作实验！

STEP 7 文库与探针杂交

实验备注区

7.1 按下表配制的杂交反应液，加入 STEP 6 的 PCR 管中，溶解重悬磁珠：

试剂	体积
TargetSeq One® Hyb Buffer	13 μ L
Hyb Human Block	5 μ L
TargetSeq® Blocking Oligo	2 μ L
RNase Block	5 μ L
Nuclease-Free Water	3 μ L
TargetSeq® Target Probes	2 μ L
总体积	30 μL



杂交反应液配制时，最后加入探针，或者在RNase Block加入后再加入探针，因为RNase Block可以保护探针。

7.2 轻轻吸打混匀，室温静置 3 min，并进行短暂离心。将 PCR 管置于磁力架上，静置 3 min。

7.3 吸取 28 μ L 上清至新的 PCR 管中，轻轻吸打混匀，瞬时离心。

7.4 设置 PCR 仪参数如下，将杂交反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	热盖温度 85°C
80°C	5 min
50°C	Hold

7.5 建议杂交时间为 16~24 h，程序结束前 30 min 进行 STEP 8。

STEP 8 捕获实验前准备

实验备注区

- 8.1 提前将 Cap Beads 从 4°C 冰箱中取出，充分混匀并置于室温平衡 30 min。
- 8.2 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇，置于室温条件下暂存，在纯化步骤中使用。
- 8.3 将 Wash Buffer 1 取出，如果有沉淀析出，请将 Wash Buffer 1 置于 37°C 水浴锅中加热，待沉淀完全溶解后再使用。
- 8.4 将 TargetSeq One® Wash Buffer 取出，置于 50°C 的水浴锅上预热。
- 8.5 取 50 μ L Cap Beads 加入新的 PCR 管内，置于磁力架上 1 min，待溶液澄清，移弃上清。



捕获所用磁珠需采用 Cap Beads，不建议使用其他型号的磁珠如 C1、M270、M280 等替代，一定不要错用成纯化磁珠！

- 8.6 从磁力架上取下 PCR 管，加入 180 μ L 的 Binding Buffer 吸打或涡旋振荡混匀，以重悬磁珠。
- 8.7 瞬时离心后将 PCR 管置于磁力架上 1 min，待溶液澄清，移弃上清。
- 8.8 重复步骤 8.6~8.7 两次，共使用 Binding Buffer 清洗磁珠三次。
- 8.9 从磁力架上取下 PCR 管，加入 180 μ L Binding Buffer 吸打或涡旋混匀，立即进行 STEP 9。

STEP 9 目标区域 DNA 捕获

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Wash Buffer 1
- TargetSeq One® Wash Buffer(50°C预热)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water
- Cap Beads (清洗后重悬在 Binding Buffer 中)

需要使用到的仪器：

- 垂直旋转混匀仪
- 恒温振荡混匀仪或金属浴
- 磁力架

- 9.1 保持 STEP 7 的杂交产物在 PCR 仪上，将 STEP 8 准备好的 180 μL Cap Beads 加入到杂交产物中，吸打混匀。
- 9.2 盖好管盖，将 PCR 管从 PCR 仪上取下，置于垂直旋转混匀仪上，转速不超过 10 rpm，室温结合 30 min（如果实验室无垂直旋转混匀仪，可以在室温下结合 30 min，期间每隔 5 min 上下颠倒数次混匀）。
- 9.3 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 9.4 从磁力架上取下 PCR 管，向 PCR 管内加入 150 μL 的 Wash Buffer 1，轻轻吸打混匀，以重悬磁珠，更换新的管盖，然后置于垂直旋转混匀仪上室温清洗 15 min，转速不超过 10 rpm。
- 9.5 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 9.6 从磁力架上取下 PCR 管，加入 150 μL 50°C 预热的 TargetSeq One® Wash Buffer，轻轻吸打混匀，瞬时离心，置于金属浴上，50°C 孵育 10 min。
- 9.7 将 PCR 管取下，瞬时离心，置于磁力架上 2 min，待溶液澄清后，移弃上清液。
- 9.8 重复步骤 9.6~9.7 两次，共使用 TargetSeq One® Wash Buffer 50°C 清洗磁珠三次。
- 9.9 保持 PCR 管在磁力架上，向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇，静置 30 s 后彻底移弃乙醇溶液（可用 10 μL 移液器移弃残留乙醇），室温晾干磁珠使残留的乙醇完全挥发。
- 9.10 向 PCR 管加入 24 μL Nuclease-Free Water，从磁力架上取下 PCR 管，短暂涡旋混匀重悬磁珠，进行 STEP 10 的扩增反应。



一定不要丢弃磁珠！捕获后的文库是结合在磁珠上的。

STEP 10 捕获后 PCR 扩增

实验备注区

需要使用到的试剂:

- Post PCR Master Mix
- Post PCR Primer

需要使用到的仪器:

- PCR 仪

10.1 提前将 Post PCR Master Mix、Post PCR Primer 从 -20°C 冰箱中取出, 置于冰盒上融化, 融化后置于冰盒上暂存。

10.2 实验前请再次核对 Post PCR Primer 是否使用正确, 短暂涡旋 Post PCR Master Mix、Post PCR Primer, 瞬时离心。

10.3 按下表配制 PCR 反应液, 注意, 此步骤是带磁珠 PCR 反应:

试剂	体积
STEP 9 得到的磁珠悬液	24 μ L
Post PCR Primer	1 μ L
Post PCR Master Mix	25 μ L
总体积	50 μ L

10.4 配制完成后, 使用移液器吸打混匀, 混匀后快速转移到 PCR 仪上, 请勿使用涡旋后离心的方法来混匀。

10.5 设置 PCR 仪程序如下, 将 PCR 反应液置于 PCR 仪上, 运行程序:

温度	时间		
热盖温度 105°C			
95°C	1 min	N 个循环	文库总投入量
98°C	20 s		750 ng
60°C	30 s		1.5 μ g
72°C	30 s		3 μ g
72°C	5 min		6 μ g
4°C	hold		
			Post-PCR 循环数
			N
			N-1
			N-2
			N-3



PCR 循环数请参考探针 Target Probe 管壁标签参数或探针说明文件, Post-PCR 循环数与杂交时文库总投入量相关, 当杂交时文库投入量较多时, 可适当降低 Post-PCR 的循环数。

因为 MGI 平台上机测序所需文库量较多, 建议多加两个循环。

10.6 程序完成后, 进行 STEP 11 的磁珠纯化。

此步骤为可暂停步骤, 可在 -20°C 下暂存一个月。

STEP 11 扩增后纯化

实验备注区

需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- 磁力架

11.1 取出纯化磁珠，混匀并置于室温平衡 30 min。



纯化步骤使用磁珠为 IGT™ Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠比例，避免纯化失败。

11.2 在 STEP 10 的 PCR 产物中，加入 1.1 倍体积的磁珠 (55 μL)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。

11.2 瞬时离心，并将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。

11.2 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s。

11.2 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s 后彻底移弃上清（可瞬时离心，将挂壁液体离心至管底，再使用 10 μL 移液器移弃底部残留的乙醇溶液）。

11.2 保持 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5 min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。

11.2 加入 25 μL 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架取下，吸打或涡旋混匀，室温静置 2 min。

11.2 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。

11.2 用移液器吸取 23 μL 上清液，转移到新的 PCR 管中；将捕获文库置于 -20℃ 冰箱中保存，捕获文库在 -20℃ 冰箱中可保存一个月。

11.2 取 1 μL 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度检测，记录文库浓度。

11.2 取 1 μL 文库使用片段分析仪进行片段文库长度检测，片段长度应与预文库长度基本一致。

实验结束，可以安排上机测序！

附录一 磁珠法文库浓缩及文库与探针杂交操作流程

需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- 磁力架

1. 取 750 ng 文库加入 PCR 管中，做好标记；多个文库混合杂交时，每个文库加入 500 ng。
2. 向文库中加入 1.8 倍体积的纯化磁珠，用移液器轻轻吸打混匀，室温孵育 5 min。
3. 把 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
4. 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s。
5. 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s 后彻底移弃上清（可瞬时离心，将挂壁液体离心至管底，再使用 10 μ L 移液器移弃底部残留的乙醇溶液）。
6. 保证 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5 min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。
7. 按下表向 PCR 管中加入杂交反应液：

试剂	体积
TargetSeq One® Hyb Buffer	13 μ L
Hyb Human Block	5 μ L
TargetSeq® Blocking Oligo	2 μ L
RNase Block	5 μ L
Nuclease-Free Water	3 μ L
TargetSeq® Target Probes	2 μ L
总体积	30 μL

8. 吸打混匀，室温静置 3 min。
9. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
10. 用移液器吸取 28 μ L 上清至新的 PCR 管中，轻轻吹打混匀，瞬时离心。
11. 设置 PCR 仪参数如下，将杂交反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	热盖温度 85°C
80°C	5 min
50°C	Hold

12. 建议杂交反应时间为 16~24 h，程序结束前 30 min 进行 STEP3 操作。



网址: www.igenetech.com
邮箱: support@igenetech.com
电话: 010-89146623
总部地址: 北京市昌平区中关村生命科学园生命园路8号院一区9号楼A座3层
嘉兴子公司地址: 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路371号2号楼

仅供研究使用, 不可用于临床诊断。

版权声明: 本手册版权属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司及其子公司所有, 未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译成其他语言。本手册中所有商标或标识均属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司、其子公司及其所有者所有。

版本号: B.0, 2022年6月
文档号: PROT220617

官方微信

