

仅供研究使用，不可用于临床诊断。

版本号：A.0（2023年1月）

文档号：PROT230102

产品技术支持与设备维保请联系：

网站：[www.igenetech.com/support](http://www.igenetech.com/support)

邮箱：[support@igenetech.com](mailto:support@igenetech.com)

# TargetSeq One<sup>®</sup> v2.0 杂交捕获自动化流程 实验操作指南（真空浓缩法）

适用于：IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

## 注意：

本操作指南不适用于 AIExome<sup>®</sup> V3 系列人全外显子组 Panel 及其半定制 Panel 产品，也不适用于 BisCap<sup>®</sup> 甲基化杂交捕获系列产品。如需使用，请参考专用操作指南。

样本制备

文库构建

杂交捕获

基因测序

生信分析





艾吉泰康生物科技（北京）有限公司

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知。

**免责声明：**在法律允许的范围内，艾吉泰康生物科技（北京）有限公司和/或其附属公司对与本文件有关或由此产生的特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性损害不承担责任，包括您对本文件的使用。

版本号	更新日期	更新内容
A.0	2023 年 1 月 29 日	全新用户手册

©2023 艾吉泰康生物科技（北京）有限公司·版权所有

# 概览

## 操作指南简介

TargetSeq One® v2.0 是艾吉泰康针对基因组目标区域进行液相探针杂交捕获的实验流程，适用于 Illumina 和 MGI 高通量测序平台。本操作指南主要是指导使用人员在 IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）上完成基于 TargetSeq One® v2.0 杂交捕获流程的自动化靶向捕获实验操作，其中需要热循环仪（PCR 仪）部分需要在线下完成。该套流程已经过重复性测试，最大程度上保证了自动化操作的稳定性和重复性。

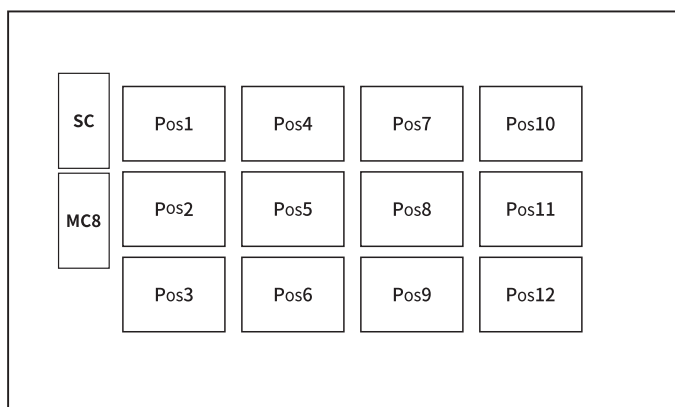
本操作指南支持 TargetSeq® 标准 Panel 产品、半定制 Panel 产品与全定制 Panel 产品，但不适用于 AIExome® V3 系列人全外显子组 Panel 及其半定制 Panel 产品，也不适用于 BisCap® 甲基化杂交捕获系列产品。如需使用，请参考专用操作指南。

## IGT-AS12 自动化液体工作站

IGT-AS12 自动化液体工作站是艾吉泰康自主研发的一款面向 NGS 实验室开发的自动化液体处理系统，可进行高效、稳定的自动化移液，能够满足中等通量下的各种复杂应用，兼容多种耗材和吸头，同时支持艾吉泰康全系列建库及捕获试剂。配套控制软件界面整洁，功能强大，提供经过验证的流程模板，支持个性化编辑。系统具有良好的灵活性和扩展性，实验结果稳定性好、重复性高。

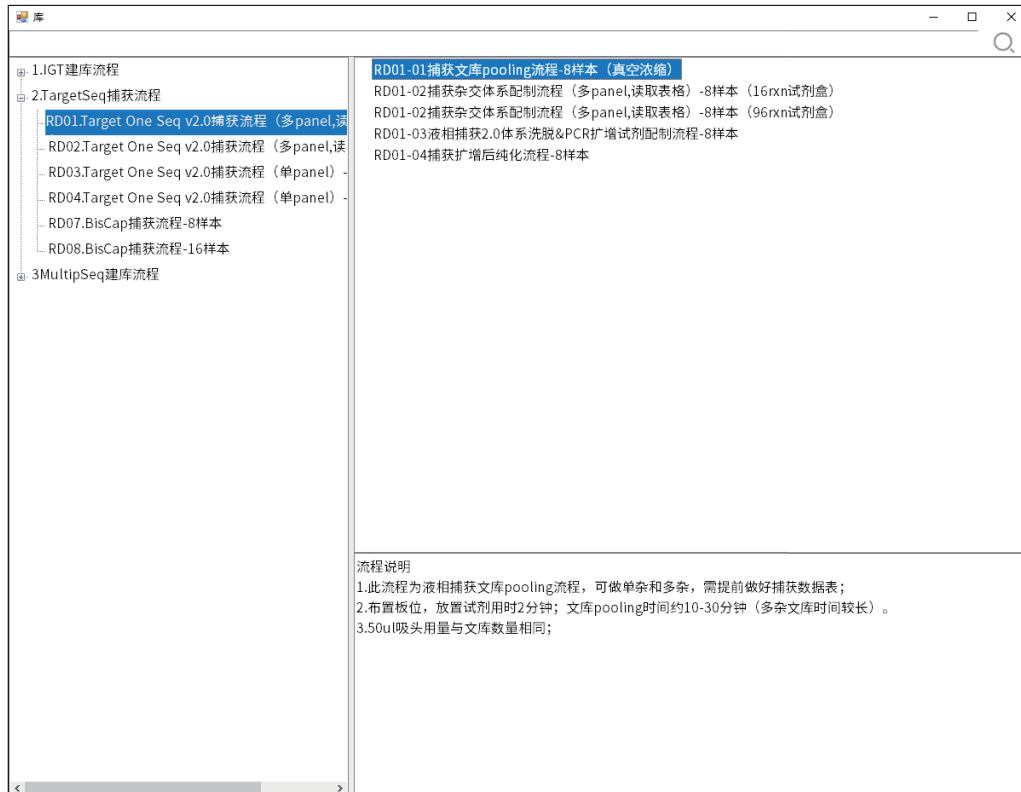
## 板位说明

IGT-AS12 自动化液体工作站拥有单通道（SC）和 8 通道（MC8）双移液器，并拥有 Pos1 ~ Pos12 共 12 个可自定义的 SBS 标准板位，各板位命名请详见下图。配置 2 版本为磁珠纯化版本，其中 Pos4 为温控模块（不可拆卸），Pos8 为磁分离模块（可拆卸），Pos12 为震荡模块（不可拆卸）。



## 流程说明

艾吉泰康提供针对 TargetSeq One® v2.0 杂交捕获实验流程的 8 样本/轮和 16 样本/轮的两套实验流程。实验流程适用于 16 rxn 和 96 rxn 两种规格的试剂盒，不可混用，请在实验中注意选择，避免使用错误。





# 实验所需试剂、仪器与耗材

## TargetSeq One® v2.0 流程试剂盒及其组成

用于本 TargetSeq One® v2.0 杂交捕获实验流程的试剂盒包括：

- 杂交洗脱试剂盒：TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0
- 封阻序列：TargetSeq® Blocking Oligo
- 目标区域探针：TargetSeq® Target Probes
- 捕获磁珠及无核酸酶水：TargetSeq® Cap Beads & Nuclease-Free Water

### 注意：

1. TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 和 TargetSeq® Blocking Oligo 拥有多个与文库类型有关的不同版本，不能混用，请根据文库类型选择正确的版本。
2. 本操作指南不适用于 AIExome® V3 系列人全外显子组 Panel 及其半定制 Panel 产品，也不适用于 BisCap® 甲基化杂交捕获系列产品。如需使用，请参考专用操作指南。

## 杂交洗脱试剂盒 TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0

TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 有针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本，需要根据预文库的类型选择正确的版本。TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 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 v2.0	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module A)	-20°C±5°C
	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module B)	15°C~25°C
	TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C)	-20°C±5°C

\* TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 有针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 文库类型的三种不同版本，Module A 和 Module B 为通用 Module，试剂盒版本与 Module C 版本对应。Module C 根据适配文库类型不同分为 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 v2.0 (Module A)

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

**TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module B)**

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
⑥*	Binding Buffer	14 mL	540 mL	15 °C~25 °C
⑥	TargetSeq One® Wash Buffer 2 v2	18 mL	108 mL	
⑥	Wash Buffer 1	4 mL	24 mL	

\* 管盖颜色⑥标识该试剂组分为瓶装。

**TargetSeq One® Hyb & Wash Kit (Module C)**

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
●	Post PCR Master Mix	450 µL	2 × 1350 µL	-20 °C±5 °C
●	Post PCR Primer (25 µM)*	21 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。

**封阻序列 TargetSeq® Blocking Oligo**

艾吉泰康提供两种 TargetSeq® Blocking Oligo 可供选择，其中 TargetSeq® Universal Blocking Oligo 可封闭6 µg以内的文库，TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo 可封闭3 µg以内的文库，请根据文库投入总量选择一种合适的 TargetSeq® Blocking Oligo。

同时，TargetSeq® Blocking Oligo 也包括针对 Illumina、MGI SI 和 MGI DI 等文库类型的多种不同版本，请根据混合杂交方式和文库类型选择合适的 TargetSeq® Blocking Oligo。

**TargetSeq® Universal Blocking Oligo**

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

**TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo**

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

## 目标区域探针 TargetSeq® Target Probes

### 注意：

本操作指南不适用于 AIExome® V3 系列人全外显子组 Panel 及其半定制 Panel 产品，也不适用于 BisCap® 甲基化杂交捕获系列产品。如需使用，请参考专用操作指南。

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
●	TargetSeq® Target Probes	36 µL	216 µL	≤ -70 °C

\* 请根据包装盒及管身标签 Panel ID、Panel Name 等字段区分不同 Panel 产品，Post-PCR 参考循环数 N 位于管身标签。

## 捕获磁珠及无核酸酶水 TargetSeq® Cap Beads & Nuclease-Free Water

管盖颜色	组分	体积			储存温度
		1000 µL each	5 mL each	50 mL each	
多种	TargetSeq® Cap Beads <sup>1</sup>	Ⓜ 1000 µL	ⓑ <sup>2</sup> 5 mL	ⓑ 50 mL	15 °C~25 °C
多种	Nuclease-Free Water	Ⓜ 1000 µL	ⓑ 5 mL	ⓑ 50 mL	

<sup>1</sup> 捕获磁珠 TargetSeq® Cap Beads 是用于杂交捕获的链霉亲和素磁珠，与纯化磁珠 IGT™ Pure Beads 不同。Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 (Thermo Fisher #65602) 可作为 TargetSeq® Cap Beads 的替代产品。

<sup>2</sup> 管盖颜色ⓑ标识该试剂组分为瓶装。

## 自备试剂、仪器与耗材

以下为 TargetSeq One® v2.0 流程试剂盒之外的用于完成实验的，需要用户自备的试剂、仪器与耗材。表中为经过艾吉泰康测试的推荐品牌型号，除 IGT-AS12 自动化液体工作站专用耗材外，可根据实验室具体情况使用已有满足实验要求的替代试剂和耗材。

### 自备试剂

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	无水乙醇	市面主流品牌	市面主流品牌
2	Nuclease-Free Water <sup>1</sup>	Nuclease-Free Water	Ambion (AM9930)
3	纯化磁珠 <sup>2</sup>	IGT™ Pure Beads	iGeneTech (C80663)
		Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (A63880)
4	片段分析仪试剂 <sup>2</sup>	S2 Cartridge (Standard Cartridge) <sup>3</sup>	BiOptic (C105101)
		Agilent DNA 1000 Kit <sup>3</sup>	Agilent (5067-1504)
5	核酸定量试剂	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (C47257)

<sup>1</sup> 试剂盒 TargetSeq® Cap Beads & Nuclease-Free Water 中包含 Nuclease-Free Water，此处为如需额外使用的采购建议。

<sup>2</sup> 推荐的纯化磁珠和片段分析仪试剂均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

<sup>3</sup> S2 Cartridge (Standard Cartridge) 需搭配 Qsep100/Qsep400 使用，Agilent DNA 1000 Kit 需搭配 2100 Bioanalyzer 使用。

## 自备仪器

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	核酸定量仪	Qubit™ 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Q33238)
2	片段分析仪 *	Qsep100/Qsep400	BiOptic (Qsep100/Qsep400)
		2100 Bioanalyzer	Agilent (G2939AA)
3	真空离心浓缩仪	SPD2010 Integrated SpeedVac	Thermo Fisher (SPD2010-220)
4	涡旋振荡器	市面主流品牌	市面主流品牌
5	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
6	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌
7	96 孔热循环仪 (PCR 仪)	市面主流品牌	市面主流品牌

\* 推荐的片段分析仪均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

## 自备耗材

### 注意：

IGT-AS12 自动化液体工作站需使用艾吉泰康指定耗材。

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	0.5 mL Qubit 管	Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher (Q32856)
2	0.2 mL 8 联排 PCR 管	市面主流品牌	市面主流品牌
3	1.5 mL 离心管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	200 µL 96 孔半裙边 PCR 板 (SBS)	市面主流品牌	市面主流品牌
5	50 µL 盒装专用移液吸头 (SBS)	50 µL 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96021)
6	200 µL 盒装专用移液吸头 (SBS)	200 µL 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96023)
7	1.2 mL 深孔板 (SBS)	1.2 mL 深孔板	iGeneTech (Q96013)
8	12 道储液槽 (SBS)	12 道储液槽	iGeneTech (Q96014)

## 实验流程图



\* 本流程图展示实验耗时以 16 样本/轮为例

### 注意:

本实验约需要 24 小时, 其中包含12 h~18 h的杂交时间, 请合理安排实验时间。

# 使用前说明

## 仪器运行

- ❑ 首次使用前，请联系艾吉泰康产品技术支持进行脚本应用的安装和仪器校准调试；
- ❑ 务必严格按照本操作指南中指导进行试剂的存储及使用；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）最多支持 16 个反应/轮的杂交捕获实验，本操作指南以 16 个反应/轮为例；
- ❑ 如有其他需求详询艾吉泰康以获得产品技术支持。

## 使用前请确认

- ❑ 提前联系艾吉泰康产品技术支持将捕获流程导入软件，并测试 IGT-AS12 自动化液体工作站捕获流程；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站需使用艾吉泰康推荐耗材；
- ❑ 加样必须使用无核酸酶的耗材和器械，最好可以对环境进行核酸酶灭活；
- ❑ 杂交捕获文库经过质检，并且是合格文库；
- ❑ 建议杂交时间为 12 h~18 h，请合理安排时间；
- ❑ 使用的杂交洗脱试剂盒 **TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0** 版本与文库是匹配的；
- ❑ 使用的封阻序列 **TargetSeq® Blocking Oligo** 版本与文库使用是匹配的。

## 实验条件控制

- ❑ 环境温度：20 °C~25 °C，环境湿度：40%~60%；
- ❑ 请穿戴个人防护装置，注意实验室安全；
- ❑ 试剂盒组分应避免反复冻融，严格根据各温度要求存放；
- ❑ 为避免交叉污染，样本、各试剂组分在溶解、充分混匀后，应离心确保全部液体置于管底且无气泡状态再开盖；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站使用前应严格进行水、75% 乙醇全面清洁，并进行紫外消毒；
- ❑ 在 IGT-AS12 自动化液体工作站运行过程中，如无意外及程序设置需要，请勿暂停及打开仪器门。

如果以上条件均满足，即可开始进行实验。

## STEP 1

# 杂交捕获实验前期准备

### 注意：

本实验约需要 24 小时，其中包含 12 h~18 h 的杂交时间，请合理安排实验时间。

### 需要用到的试剂：


- TargetSeq® Blocking Oligo
- TargetSeq® Target Probes
- Hyb Human Block
- RNase Block
- TargetSeq One® Hyb Buffer v2

### 1.1 试剂准备：

- 1.1.1 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；
- 1.1.2 将需要用到的 **TargetSeq® Target Probes** 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；
- 1.1.3 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；
- 1.1.4 将 **TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module A)** 中的 **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；
- 1.1.5 将 **TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module A)** 中的 **TargetSeq One® Hyb Buffer v2** 取出，室温融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，需要将 **TargetSeq One® Hyb Buffer v2** 置于 37 °C 水浴锅中加热，待试剂完全溶解后再使用。

### 1.2 IGT-AS12 设备及控制软件开启：

- 1.2.1 依次打开 IGT-AS12 自动化液体工作站主机和控制电脑的电源开关，并将温控模块和振荡模块通电；

- 1.2.2 双击桌面控制软件快捷方式  打开控制软件，在登录界面输入账号密码登录控制软件，默认用户名为“User”，默认初始密码为“1”，登录密码登录后可在主页右上角**用户管理（显示为用户名）**菜单自行修改，点击登录界面程序。

## STEP 2

# 文库与探针杂交

### 需要用到的试剂：

- TargetSeq One® Hyb Buffer v2
- Hyb Human Block
- Nuclease-Free Water
- TargetSeq® Blocking Oligo
- TargetSeq® Target Probes
- RNase Block

### 需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）
- 真空离心浓缩仪

### 2.1 捕获文库 Pooling：

2.1.1 将质检合格的文库按照单杂文库取750 ng，多个文库混合杂交时，每个文库加入500 ng，提前将本次实验所需的 Excel 模板文档制作好，用于下一步导入程序时使用；

**提示：**TargetSeq® Blocking Oligo 包含封阻能力不同两个版本：**TargetSeq® Universal Blocking Oligo** 可封闭6 µg以内的文库，**TargetSeq® Eco Universal Blocking Oligo** 可封闭3 µg以内的文库，请根据文库投入总量选择一种合适的 **TargetSeq® Blocking Oligo**。

2.1.2 将质检合格需要捕获的文库提前按照 Excel 模板文档进行排序。

### 2.2 文库 Pooling 自动化操作流程：

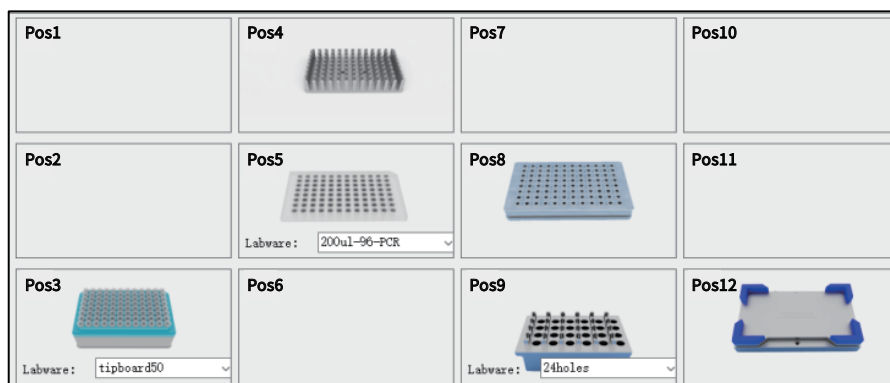
2.2.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **TargetSeq One v2.0-16 样本流程**，选择 **RD02-01 捕获文库 Pooling 流程-16 样本**；

2.2.2 进入程序后，导入制作好的 Excel 模板文档，然后按照下表于布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
50 µL盒装透明移液吸头	Tip50	Pos3
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos5
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
24 孔离心管适配器	Adapter24EP	Pos9



具体位置如下图所示：



2.2.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
质检合格的文库	-	8 连 PCR 管	Pos5:A1-H12
文库 Pooling 收集管	-	1.5mL 离心管	Pos9:A1-D4

具体位置如下图所示：



2.2.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

**提示：** 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

2.2.5 文库 Pooling 结束后，取出 **Pos9:A1-D4** 位置的文库 Pooling 收集管，扣盖振荡混匀并离心；

2.2.6 清理台面，如有剩余试剂，取下试剂并按照管标签上的温度储存。

2.3 将离心管放入真空离心浓缩仪，打开管盖，浓缩至干燥状态；

**提示：** 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。

## 2.4 杂交捕获体系配制流程：

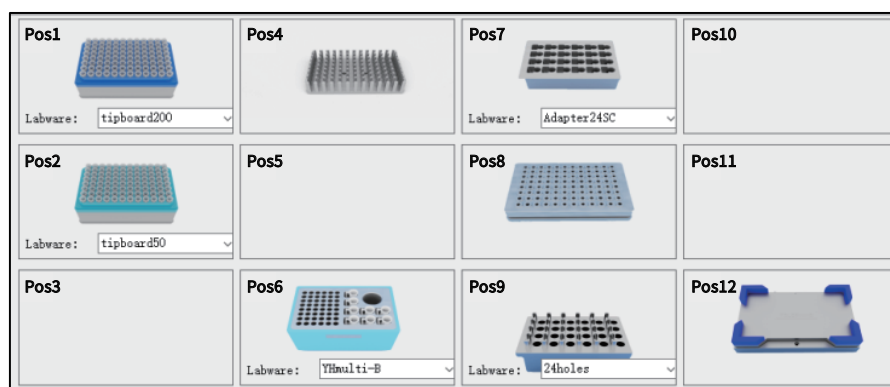
2.4.1 在程序界面点击菜单栏 **Libraries**，选择 **TargetSeq 捕获流程的 TargetSeq One v2.0-16 样本流程**，选择 **RD02-02 捕获杂交体系配制流程-16 样本**；

**提示：**流程 **RD02-02 捕获杂交体系配制流程-16 样本**针对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本，请根据实际情况选择，错误使用将导致实验失败。

## 2.4.2 进入程序后，导入制作好的 Excel 模板文档，然后按照下表于布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 $\mu$ L 盒装透明移液吸头	Tip200	Pos1
50 $\mu$ L 盒装透明移液吸头	Tip50	Pos2
多功能冰盒适配器	IceAdapterMF	Pos6
24 孔螺帽管适配器	Adapter24SC	Pos7
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
24 孔离心管适配器	Adapter24EP	Pos9

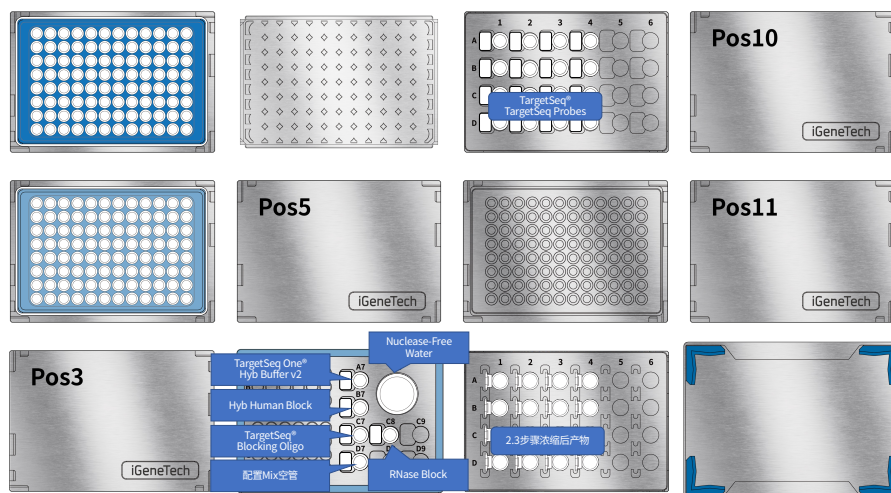
具体位置如下图所示：

2.4.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **“Next”** 进入程序界面；

组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
TargetSeq One® Hyb Buffer v2	360 $\mu$ L	螺帽管 *	Pos6:A7
Nuclease-Free Water	60 $\mu$ L	8 mL/15 mL窄口瓶	Pos6:A8
Hyb Human Block	88 $\mu$ L	螺帽管 *	Pos6:B7
TargetSeq® Blocking Oligo	36 $\mu$ L	螺帽管 *	Pos6:C7
RNase Block	88 $\mu$ L	螺帽管 *	Pos6:C8
配制 Mix 空管	-	1.5 mL离心管	Pos6:D7
TargetSeq® Target Probes	38 $\mu$ L	螺帽管 *	Pos7:A1-D4
2.3 步骤浓缩后产物	-	1.5 mL离心管	Pos9:A1-D4

\* 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。16 rxn 和 96 rxn 规格试剂盒螺帽管有所区别，请注意区分。

具体位置如下图所示：



2.4.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

**提示：** 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

2.4.5 流程结束后，取出 **Pos9:A1-D4** 的 1.5 mL 离心管，盖上管盖，涡旋振荡 30 s 以确保干燥在管底的 DNA 溶解，并短暂离心，然后手动转移至 PCR 管中，放入 PCR 仪进行杂交；

2.4.6 清理台面，如有剩余试剂，取下试剂并按照管标签上的温度储存。

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：

热盖温度85℃		
步骤	温度	时间
1	80℃	5 min
2	50℃	Hold

2.6 建议杂交时间为12 h~18 h，程序结束前30 min进行 STEP 3。

## STEP 3

# 捕获实验前准备

### 需要用到的试剂：

- 捕获磁珠 TargetSeq® Cap Beads
- 无水乙醇
- Nuclease-Free Water
- TargetSeq One® Wash Buffer 2 v2

### 3.1 试剂准备：

- 3.1.1 提前将 **TargetSeq® Cap Beads & Nuclease-Free Water** 中的 **TargetSeq® Cap Beads** 从4℃冰箱中取出，充分混匀并置于室温平衡30 min；


#### 注意：

捕获所用磁珠需采用 **TargetSeq® 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 **IGT™ Pure Beads!**

- 3.1.2 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；
- 3.1.3 将 **TargetSeq One® Hyb & Wash Kit v2.0 (Module B)** 中的 **TargetSeq One® Wash Buffer 2 v2** 取出，置于50℃的水浴锅上预热，待试剂完全溶解后再使用。

### 3.2 IGT-AS12 设备及控制软件开启：

- 3.2.1 依次打开 IGT-AS12 自动化液体工作站主机和控制电脑的电源开关，并将温控模块和振荡模块通电；

- 3.2.2 双击桌面控制软件快捷方式  打开控制软件，在登录界面输入账号密码登录控制软件，默认用户名为“User”，默认初始密码为“1”，登录密码登录后可在主页右上角**用户管理（显示为用户名）**菜单自行修改，点击登录界面程序。

## STEP 4

## 目标区域 DNA 捕获和 PCR 扩增

## 需要用的试剂：

- TargetSeq One® Wash Buffer 2 v2
- Binding Buffer
- 80% 乙醇
- TargetSeq® Cap Beads
- Nuclease-Free Water
- Post PCR Master Mix
- Post PCR Primer (25 μM)

## 需要用的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）

## 4.1 自动化仪器捕获洗脱流程操作:

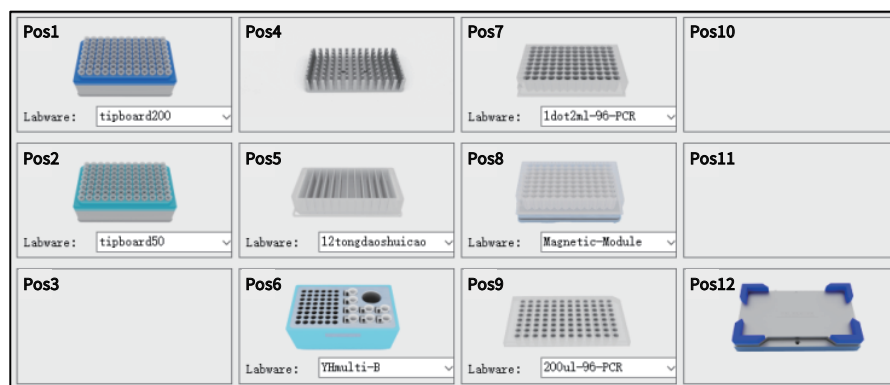
4.1.1 在程序界面点击菜单栏 **Libraries**，选择 **TargetSeq 捕获流程的 TargetSeq One v2.0-16 样本流程**，选择 **RD02-03 捕获 2.0 体系洗脱 & PCR 扩增试剂配制流程-16 样本**；

4.1.2 进入程序后，按照下表于布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μL 盒装透明移液吸头	Tip200	Pos1
50 μL 盒装透明移液吸头	Tip50	Pos2
12 道试剂槽 *	Reservoir12	Pos5
多功能冰盒适配器	IceAdapterMF	Pos6
1.2 mL 深孔板	DWP_1200uL	Pos7
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
1.2 mL 深孔板	DWP_1200uL	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9

\* 请于 4.1.3 分装试剂后摆放

具体位置如下图所示：



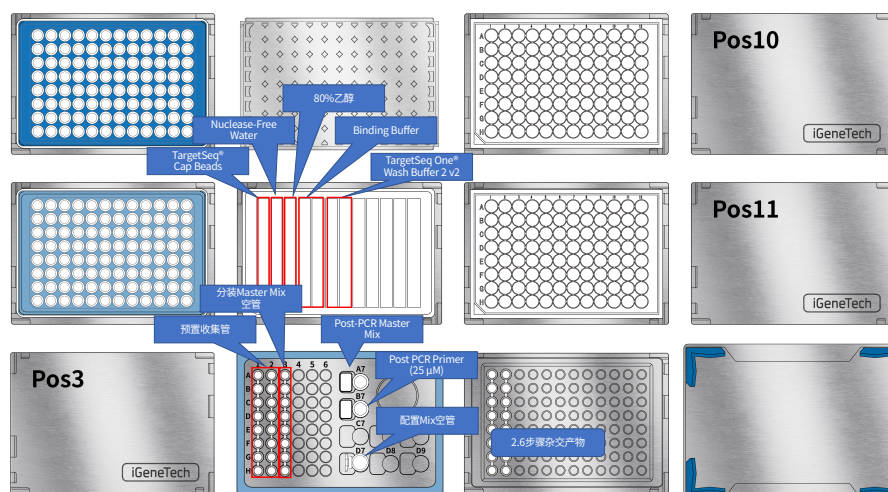
4.1.3 照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后并打勾，然后进入程序界面；

组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
TargetSeq® Cap Beads	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A1-H1
Nuclease-Free Water	2.5 mL		Pos5:A2-H2
80% 乙醇	10 mL		Pos5:A3-H3
Binding Buffer	7 mL/列		Pos5:A4-H5
TargetSeq One® Wash Buffer 2 v2	8 mL/列		Pos5:A6-H7
预置收集管	-	8 连 PCR 管	Pos6:A1-H2
分装 Master Mix 空管	-	8 连 PCR 管	Pos6:A3-H3
Post PCR Master Mix	450 μL	螺帽管 <sup>1</sup>	Pos6:A7
Post PCR Primer (25 μM)	20 μL	螺帽管 <sup>1</sup>	Pos6:B7
配制 Mix 空管	-	1.5 mL 离心管	Pos6:D7
2.6 步骤杂交产物 <sup>2</sup>	-	8 连 PCR 管	Pos9:A1-H2

<sup>1</sup> 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。

<sup>2</sup> 保持 2.6 步骤的杂交产物在热循环仪（PCR 仪）上，直至仪器运行至弹框提示放置杂交产物时（步骤 4.1.5），从热循环仪（PCR 仪）取出杂交产物，放置仪器 **Pos9:A1-H2** 列，点击弹框确认继续操作。

具体位置如下图所示：



4.1.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

**提示：** 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

4.1.5 仪器运行至弹框提示放置杂交产物时，将 2.6 步骤的杂交产物从热循环仪（PCR 仪）取出，放置在 **Pos9:A1-H2** 列，点击弹框确认继续操作；

4.1.6 流程结束后，取出 **Pos6:A1-H2** 的 8 连 PCR 管，盖上管盖，涡旋振荡 30 s；

4.1.7 取下 **Pos6** 板位的的多功能冰盒适配器 (IceAdapterMF)，如有剩余试剂，取下试剂并按照管标签上的温度储存。

**注意：**

请勿清理台面，其余适配器、剩余耗材和试剂将在 STEP 5 继续使用。

4.2 设置热循环仪 (PCR 仪) 程序如下，将 4.1.6 步骤的 PCR 反应液置于热循环仪 (PCR 仪) 上，运行程序；

热盖温度 105 °C			
步骤	循环数	温度	时间
1	1	95 °C	1 min
2	见右表	98 °C	20 s
		60 °C	30 s
		72 °C	30 s
3	1	72 °C	5 min
4	1	4 °C	Hold

文库投入总量	PCR 循环数	
	Illumina 文库	MGI 文库
750 ng	N	N+2
1.5 µg	N-1	N+1
3 µg	N-2	N
6 µg	N-3	N-1

**提示：** Post-PCR 参考循环数 **N** 请参考探针 **TargetSeq® Target Probes** 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。

4.3 程序完成后，进行 STEP 5 的磁珠纯化。



## STEP 5

## 扩增后纯化

## 需要用到的试剂：

- 纯化磁珠 IGT™ Pure Beads

## 需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

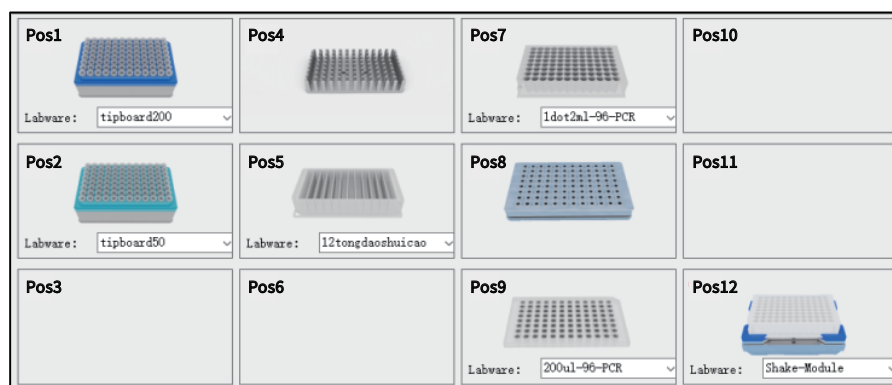
## 5.1 自动化仪器捕获扩增纯化流程操作：

5.1.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **TargetSeq 捕获流程** 的 **TargetSeq One v2.0-16 样本流程**，选择 **RD02-04 捕获扩增后纯化流程-16 样本**；

5.1.2 进入程序后，在 STEP 4 板位基础上继续实验，检查板位布局应如下所示；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μL 盒装透明移液吸头	Tip200	Pos1
50 μL 盒装透明移液吸头	Tip50	Pos2
12 道试剂槽	Reservior12	Pos5
1.2 mL 深孔板	DWP_1200uL	Pos7
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9
1.2 mL 深孔板	DWP_1200uL	Pos12

具体位置如下图所示：





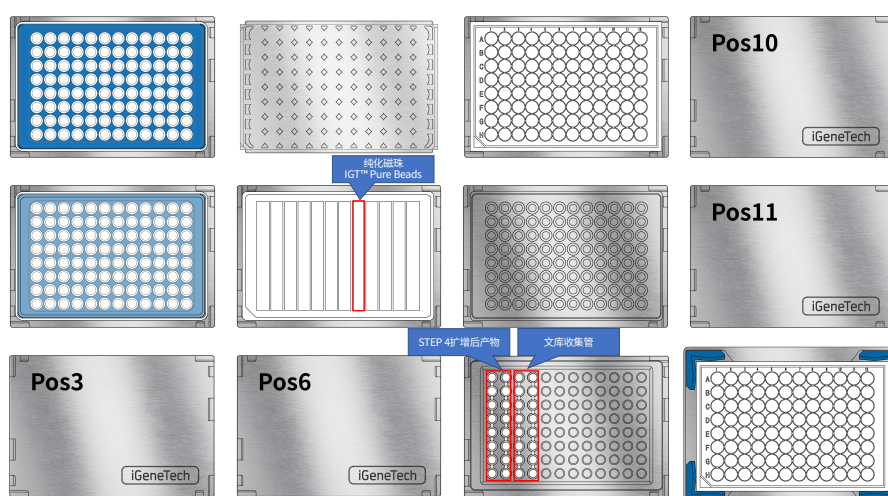
5.1.3 照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后并打勾，然后进入程序界面；

组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
纯化磁珠 IGT™ Pure Beads*	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A8-H8
STEP 4 扩增后产物	-	8 连 PCR 管	Pos9:A1-H2
文库收集管	-	8 连 PCR 管	Pos9:A3-H4

\* 使用磁珠为 IGT™ Pure Beads，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用量。

**提示：**磁珠纯化所需的 80% 乙醇和 Nuclease-Free Water 上步 STEP 4 已分装，此步纯化无需再准备。

具体位置如下图所示：



5.1.4 程序结束后，取出 **Pos9:A3-H4** 的文库收集管，即为纯化后产物。

- 5.2 取1  $\mu$ L文库使用 **Qubit dsDNA HS Assay Kit** 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度测定，记录文库浓度；
- 5.3 取1  $\mu$ L文库使用片段分析仪进行片段质检，片段大小应与预文库大小基本一致。

杂交捕获实验结束，可以安排上机测序。



网址: [www.igenetech.com/support](http://www.igenetech.com/support)

邮箱: [support@igenetech.com](mailto:support@igenetech.com)

总部地址: 北京市昌平区中关村生命科学园 8 号院一区 9 号楼 A 座 3 层

嘉兴子公司: 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路 371 号 2 号楼

官方微信



仅供科研使用, 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: A.0 (2023 年 1 月)

文档号: PROT230102