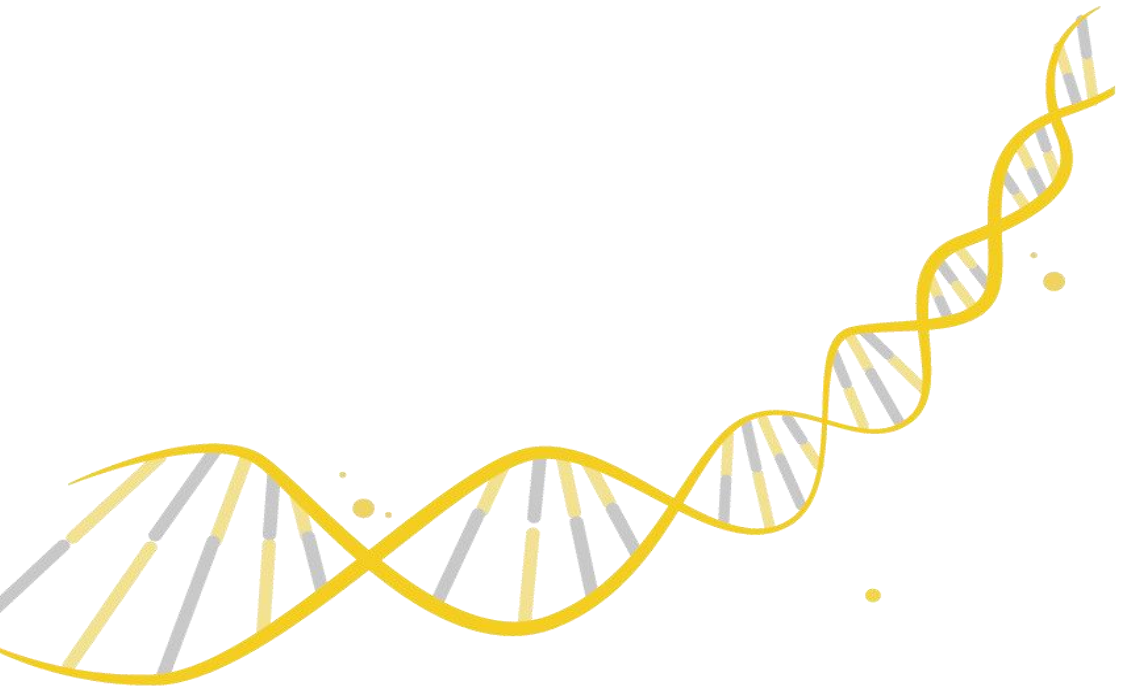




sCAP Hybridization and Wash Kit

RK20266



www.abclonal.com
version: N16A11v2.1

目录

1. 产品概述	1
2. 杂交捕获体系产品组分	2
3. 产品运输与保存	2
4. 产品应用	3
5. 其他自备材料	3
6. 注意事项	4
7. 操作步骤	7
第一步 封闭制备好的文库	7
第二步 封闭后文库与探针杂交	7
第三步 洗脱 Buffer 及链霉亲和素磁珠的准备	8
第四步 磁珠捕获及洗脱	10
第五步 进行 Post-capture PCR	12
第六步 捕获文库质检	13
8. 附录	14

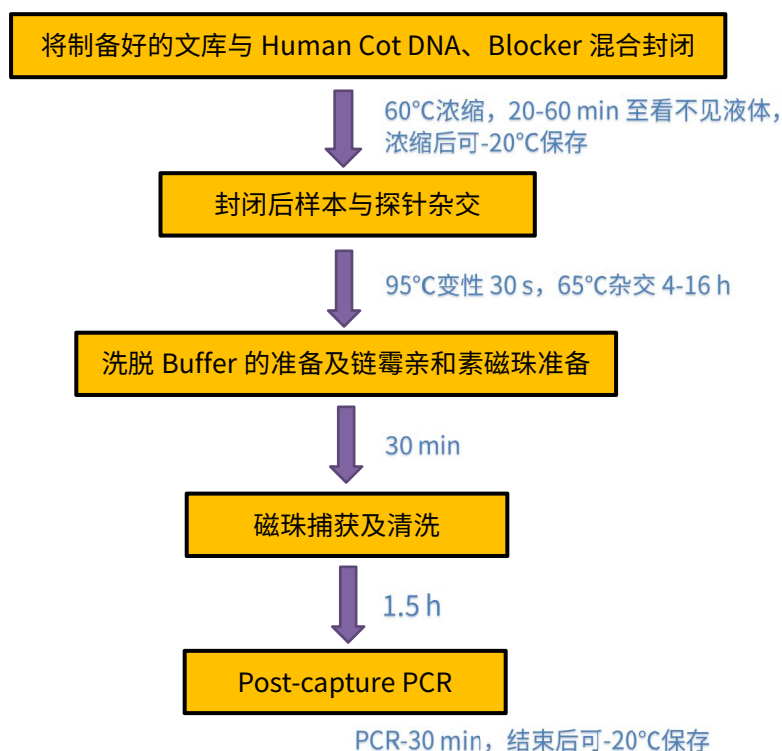
1. 产品概述

ABclonal 杂交捕获体系提供了适用于 Illumina 高通量测序平台的杂交捕获试剂，其中包括杂交缓冲液试剂、洗脱缓冲液试剂、人基因组重复序列封闭试剂、文库接头封闭试剂、捕获磁珠、PCR 扩增试剂和 PCR 扩增引物。

ABclonal 杂交捕获体系具有良好的灵敏性和特异性，可以广泛应用于复杂疾病相关致病基因的研究以及健康筛查等众多领域。客户可根据自身需求，整套购买，或选择部分试剂来搭配自己的杂交捕获试剂使用，所有试剂均可单独购买。

试剂盒组分经过了严格的质量控制，主要包括组分污染测试、功能性试验验证、应用场景测试和产品批间次稳定性测试等工序。

杂交捕获实验流程



2. 杂交捕获体系产品组分

包装盒	货号	规格	组分	储存
sCAP Hybridization and Wash Kit	RK20266	4 / 16 RXN	● 2X Bead Washing Buffer	-20°C
			● 2X Hybridization Buffer	-20°C
			● 10X High Stringency Buffer	-20°C
			● 10X Low Stringency Buffer	-20°C
			● 10X Washing Buffer I	-20°C
			● 10X Washing Buffer II	-20°C
			● Hybridization Buffer Enhancer	-20°C
Streptavidin Beads	RK20270	4 / 16 RXN	● Streptavidin beads	4°C
Human Cot DNA	RK20268	4 / 16 RXN	● Human Cot DNA	-20°C
ILM Universal Blockers-X1	RK20269	4 / 16 RXN	● ILM Universal Blockers-X1	-20°C
Amplification Module for Illumina	RK20267	8 / 24 RXN	● Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	-20°C
			● 10X PCR Primers	-20°C

3. 产品运输与保存

除 Streptavidin beads 需在 4°C 条件下保存和运输外, ABclonal 杂交捕获试剂盒与其他配套试剂必须保存在 -25°C 至 -15°C 条件下。该试剂盒对温度比较敏感, 长途运输尽量采用干冰运输条件, 或者干冰结合冰袋方式。

4. 产品应用

目标序列靶向测序可以仅对感兴趣的基因组区域进行富集测序，不仅能够有效降低测序成本，还可以对目标区域进行深度测序，增加了目标区域内遗传变异的检测灵敏度和准确性，所以非常适合基因分型和稀有变异检测。由于杂交探针捕获不需要 PCR 引物设计，因此遗漏突变的可能性较小，而且在序列复杂性方面表现更好。因其准确经济高效的优势，在临床诊断领域，包括遗传病辅助诊断、无创单基因病诊断、肿瘤伴随诊断、病原体检测等方面，正得到越来越广泛的应用。

5. 其他自备材料

◆ 纯化磁珠

- ✧ 推荐高质量和稳定性的 DNA 纯化磁珠，如 AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257)。

◆ DNA 质控

- ✧ Agilent 公司 2100 Bioanalyzer 等生物分子分析仪与耗材试剂进行 DNA 片段大小分析；Life 公司 Qubit 核酸定量仪器与试剂进行 DNA 浓度测定。

◆ 其它试剂

- ✧ ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (ABclonal, Cat.NO. RK30140)。
- ✧ 80%乙醇溶液（新鲜配制），Nuclease-Free Water 等。

◆ 其他耗材和仪器

- ✧ 低吸附 EP 管、移液吸头、低吸附薄壁 PCR 管（200 μ L）、磁力架、单道或多道移液器。
- ✧ PCR 仪器、（漩涡）振荡器、桌面微型离心机、旋转真空浓缩仪。

6. 注意事项

6.1 关于试剂和仪器准备

6.1.1 Streptavidin Beads 和 DNA 纯化磁珠使用前应先平衡至室温，建议提前半小时从 4℃ 拿出，混匀后室温放置，使用前需要充分混匀，否则会导致得率下降。

6.1.2 试剂使用前，尽量保证完全溶解无沉淀，混匀后瞬时离心至管底。10X High Stringency Buffer、10X Low Stringency Buffer 在室温溶解后可能会有少许浑浊，此时可以 65℃ 水浴至澄清后，再稀释至 1× 使用。2X Hybridization Buffer 在使用前如果发现有结晶析出，应在 65℃ 水浴锅中水浴至完全溶解后使用。试剂使用后，应尽快放置于 -25℃ 至 -15℃ 条件下保存。

6.1.3 实验之前请熟悉整个操作流程，特别是注意事项，需要预设置真空浓缩仪、PCR 仪和金属浴等温控设备，注意准确设置反应温度和热盖温度。

6.2 关于文库浓缩

6.2.1 推荐使用真空浓缩仪对混合后的 DNA 文库进行浓缩，此方法操作简便，而且 DNA 文库损失低，可以获取高质量的文库样本。

6.2.2 也可以使用磁珠浓缩法对混合后的 DNA 文库进行浓缩，此方法不需要另购置真空浓缩仪，可以更好地兼容自动化工作站，但存在一定的 DNA 文库损失且试剂需求量增加，存在轻微 GC 偏好性，操作方法详见附录。

6.2.3 浓缩时间可根据液体体积预估，可在实验前测试液体体积与对应浓缩时间的大概经验值，浓缩时间不宜过长，但必须保证文库混合液完全蒸干，否则杂交体系的不准确将影响文库捕获效率。

6.3 关于杂交样本个数

6.3.1 ABclonal 提供的杂交捕获体系可以满足 1-12 杂不同需求，一般情况下，建议文库混杂投入比 > 50%（混杂投入比 = $\frac{\text{单个样本投入杂交捕获的文库量}}{\text{单个样本文库构建总产量}} \times 100\%$ ）。

6.3.2 对于 Size 分布均一、所需测序数据量相同的文库，推荐在文库混杂投入比 > 50% 的前提下，每个文库均投入 500 ng 混杂，以提高文库丰富度，降低测

sCAP Hybridization and Wash Kit

序数据的重复率。

6.3.3 对于 Size 分布不均一、样本质量差异较大、所需测序数据量不同的文库，建议样本质量比较接近且测序数据量相同的文库进行混杂，有助于不同子文库之间均衡数据的产出。

6.4 关于杂交时间

6.4.1 ABclonal 提供的杂交捕获体系可适用于 2-16 hr 杂交。但与 16 hr 杂交相比，不同大小的 Panel 随着杂交时长的缩短，在捕获文库产量、捕获效率、覆盖均一性等方面稍微降低。

6.4.2 一般情况下，相比中大型 Panel (>0.4 Mb)，小型 Panel (<0.4 Mb) 在杂交时间缩短时，受到的影响更大。对于有时效性要求的，可对大型 Panel 尝试缩短杂交时间，但不建议将此种情况用于小型 Panel。

6.5 关于 PCR 循环数

6.5.1 捕获后文库产量与许多因素相关，除去实验操作的影响外，一般会有以下理论影响因素：样本类型、起始混杂文库总量、Panel 大小、杂交时长、扩增循环数等。为获得良好的实验数据，在满足上机测序所需用量的前提下，应尽量控制捕获后扩增循环数。

6.5.2 Illumina 平台在上机测序前会对文库进行指数式扩增的成簇反应，故所需的上机文库总量较低。可根据 Panel 大小的不同，在实验初期参考下表中推荐的循环数，后期再根据具体结果进行调整：

Probe Panel size	1-plex	4-plex	8-plex	12-plex
>100,000 probes	10 cycles	8 cycles	7 cycles	6 cycles
10,000-100,000 probes	12 cycles	10 cycles	9 cycles	8 cycles
500-10,000 probes	13 cycles	11 cycles	10 cycles	10 cycles
1-500 probes	14 cycles	12 cycles	11 cycles	11 cycles

6.6 关于温度控制

6.6.1 杂交捕获洗脱过程中，对温度的控制较为严格，直接影响到实验操作的成功率和测序数据表现，需要特别注意。尤其是在需要 65°C 操作时，注意温控仪器的温度偏差不要超过 0.5°C，主要有以下几点：

- a) 杂交时体系温度需要保持在 65°C，应使用 PCR 仪，设置热盖温度为 100°C。
- b) Streptavidin Beads 捕获时，应保持反应体系在 65°C PCR 仪中，设置热盖温度为 75°C。每 10-12 min 取出 PCR 管轻轻振荡混匀，防止磁珠沉降。每次取出振荡混匀时要迅速，3-4 s 即可，使反应体系保持在 65°C，尽量避免温度降低。
- c) 热洗脱步骤对温度要求较严格，每次操作尽量保持在 65°C，避免温度降低。混匀时可以轻轻颠倒混匀，防止气泡产生。
- d) 实验室内环境温度必须稳定在 20-25°C，温度过低会影响洗脱实验操作的稳定性。

6.7 关于仪器和耗材选择

6.7.1 使用 PCR 仪过夜杂交时，建议提前对杂交体系损耗进行测试：使用 17 μ L Nuclease-Free Water 代替杂交体系进行测试，65°C 反应 12 h，体积损失应小于 0.5 μ L，确保 PCR 管及 96 孔板的密封性良好。

6.7.2 捕获实验中所用的实验耗材，如离心管、移液器吸头等，请务必使用低吸附系列，避免样本损失。

7. 操作步骤

该操作步骤主要包括：将制备好的文库与 Human Cot DNA、Blockers 混合封闭，封闭后样本与探针杂交，洗脱 Buffer 的准备及链霉亲和素磁珠准备，磁珠捕获及洗脱，Post-capture PCR。

第一步 封闭制备好的文库

1.1 将 Blockers 与 Human Cot DNA 放置室温溶解，旋涡振荡混匀并离心，置于冰上备用。

1.2 取一个新的 1.5 mL 管，配制如下封闭反应体系：

组分	体积
DNA library	500 ng DNA Library each
● Human Cot DNA	5 μ L
● Blockers	2 μ L

1.3 涡旋振荡混匀，瞬时离心至管底部。用真空浓缩仪在 60°C 条件下进行浓缩，至看不见液体为止。

安全停止点：浓缩好的混合物可以暂时放置在 4°C 过夜，或者 -20°C 保存 1-2 周左右。

第二步 封闭后文库与探针杂交

2.1 将 ABclonal Hybridization and Wash Kit 置于室温融化。

注：2X Hybridization Buffer 必须充分融解至完全无结晶。如室温无法融解，可置于 65°C 水浴中孵育约 10-30 min，期间涡旋混匀，直到结晶完全溶解。

2.2 对于浓缩后的混合物，按照下表加入其它组分：

组分	体积
● 2X Hybridization Buffer	8.5 μ L
● Hybridization Buffer Enhancer	2.7 μ L
Capture Probes	4 μ L
Nuclease-Free Water	1.8 μ L
Total Volume	17 μ L

2.3 用移液枪吹打数次混匀后，室温孵育 5-10 min。

2.4 轻轻旋涡混匀后，短暂离心。

2.5 将 1.5 mL 管中的液体转移至 0.2 mL 的 PCR 管中并短暂离心，将液体离至管底。

2.6 盖紧管盖，立即放入提前预热至 95°C 的 PCR 仪中，保持 100°C 热盖，按照下表程序进行反应：

温度	时间
95°C	30 s
65°C	4-16 hr
65°C	Hold

第三步 洗脱 Buffer 及链霉亲和素磁珠的准备

3.1 准备洗脱 Buffer

3.1.1 根据杂交捕获反应个数 N，按照下表配置 1X Working Buffer，配置好的 1X Working Buffer 可以室温放置保存 1 个月。

组分	Concentrated Buffer	Nuclease-Free Water	1X Working Buffer
● 2X Bead Washing Buffer	N * 160 μ L	N * 160 μ L	N * 320 μ L
● 10X Low Stringency Buffer	N * 28 μ L	N * 252 μ L	N * 280 μ L
● 10X High Stringency Buffer	N * 32 μ L	N * 288 μ L	N * 320 μ L
● 10X Washing Buffer I	N * 16 μ L	N * 144 μ L	N * 160 μ L
● 10X Washing Buffer II	N * 16 μ L	N * 144 μ L	N * 160 μ L

3.1.2 根据杂交捕获反应个数 N，按照下表体积对稀释后的 1X Low Stringency Buffer 和 1X High Stringency Buffer 进行预热，至少预热 30 min 后才能使用，并确保管盖盖紧，避免液体蒸发损失。

组分	体积	温度
1X Low Stringency Buffer	N * 120 μ L	65°C
1X High Stringency Buffer	N * 320 μ L	65°C

3.1.3 剩余的 N * 160 μ L 1X Low Stringency Buffer 保持在室温，以备常温洗脱。

3.2 链霉亲和素磁珠准备

注：链霉亲和素磁珠准备过程中，每次在磁力架上去除上清后，磁珠均不需要晾干，可直接进行下一步。

3.2.1 提前将链霉亲和素磁珠从 4°C 冰箱取出，放置室温孵育至少 30 min。

3.2.2 充分旋涡振荡磁珠，使其完全悬浮起来。

3.2.3 对于每个杂交反应，取 50 μ L Streptavidin Beads 于 0.2 mL PCR 管中。

3.2.4 将 PCR 管置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

3.2.5 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 100 μ L 1X Bead Washing Buffer，旋涡振荡 30 s。

3.2.6 再次将 PCR 管置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

3.2.7 重复步骤 3.2.5 和 3.2.6 两遍（少量的 Buffer 残留不会影响文库与 Beads sCAP Hybridization and Wash Kit

结合)。

3.2.8 在每个杂交反应的磁珠中，加入按照下表组分配置的磁珠重悬液：

组分	体积
● 2X Hybridization Buffer	8.5 μL
● Hybridization Buffer Enhancer	2.7 μL
Nuclease-Free Water	5.8 μL
Total Volume	17 μL

3.2.9 充分旋涡振荡，混匀磁珠，轻轻瞬时离心，即得磁珠混合液。

第四步 磁珠捕获及洗脱

4.1 磁珠捕获

4.1.1 保持步骤 2.6 中的杂交混合液处于 65°C，将磁珠混合液（步骤 3.2.9 产物）加入杂交混合液中，瞬时离心，轻轻涡旋振荡，使磁珠重悬均匀，液体不要溅到管盖上。

4.1.2 将 PCR 管置于预先设置好的 PCR 仪上，65°C 孵育 45 min（热盖 75°C），期间每 10-12 min 取出 PCR 管轻轻振荡混匀，防止磁珠沉降。

4.1.3 混匀时尽量避免液体溅到管盖上。每次取出振荡混匀时要迅速，使反应体系保持在 65°C，尽量避免温度降低。

4.2 洗脱

4.2.1 热洗脱

注 1：热洗脱步骤对温度要求较严格，每次操作尽量保持在 65°C，避免温度降低。

注 2：如果同时操作多个样本，每次加入预热的 1X Low Stringency Buffer 和 1X High Stringency Buffer 时，每个样本间都需要更换枪头，避免 Buffer 量不足。

(1) 步骤 4.1 结束后，保持 PCR 管在 65°C PCR 仪上，立即加入 100 μL 预热的 1X Low Stringency Buffer，颠倒混匀，防止气泡产生。

(2) 短暂离心，放置于磁力架上，至溶液澄清去除上清。

(3) 将 PCR 管移出磁力架，放在 65°C PCR 仪上，立即加入 150 μ L 预热的 1X High Stringency Buffer，颠倒混匀，防止气泡产生。

(4) 将 PCR 管置于 65°C 孵育 5 min。

(5) 短暂离心，将 PCR 管置于磁力架上，至溶液澄清后去除上清。

(6) 重复步骤 (3) - (5) 一次。

4.2.2 室温洗脱

注：洗脱步骤中，每次去除上清后，磁珠无需晾干，立即进行下一步。

(1) 加入 150 μ L 室温的 1X Low Stringency Buffer，轻轻振荡混匀。

(2) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 s 混匀一次。

(3) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

(4) 将 PCR 管移出磁力架，加入 150 μ L 室温的 1X Washing Buffer I，轻轻振荡混匀。

(5) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 s 混匀一次。

(6) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

(7) 将 PCR 管移出磁力架，加入 150 μ L 室温的 1X Washing Buffer II，轻轻振荡混匀。

(8) 室温孵育 2 min，期间每隔 30 s 混匀一次。

(9) 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上 1 min，至溶液澄清后吸除上清。

(10) 加入 20 μ L Nuclease-Free Water，用移液枪上下吹打数次，将磁珠完全重悬，然后进行 PCR 扩增。

注：本步骤不要丢弃磁珠，需要捕获产物和磁珠一起进行 PCR 扩增。

第五步 进行 Post-capture PCR

5.1 按照下表配制扩增体系：

组分	体积
Library-bounded beads (步骤 4.2.2-(10)产物)	20 μ L
● 10X PCR Primer	1.25 μ L
● Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μ L
Nuclease-Free Water	3.75 μ L
总体积	50 μ L

5.2 瞬时离心，轻轻涡旋振荡，使磁珠重悬均匀，注意不要溅到管盖上。然后，立即进行 PCR 反应，PCR 程序如下表所示：

温度	时间	循环数
98°C	45 s	1
98°C	15 s	Variable
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

5.3 Illumina 平台过夜杂交推荐的 PCR 循环数：

Probe Panel size	1-plex	4-plex	8-plex	12-plex
>100,000 probes	10 cycles	8 cycles	7 cycles	6 cycles
10,000-100,000 probes	12 cycles	10 cycles	9 cycles	8 cycles
500-10,000 probes	13 cycles	11 cycles	10 cycles	10 cycles
1-500 probes	14 cycles	12 cycles	11 cycles	11 cycles

注：如需 4 h 快速杂交，PCR 的循环数相应过夜杂交的循环数增加一个。

5.4 PCR 反应结束后，直接进行产物纯化。

5.4.1 在每个样本管中加 75 μL (1.5 $\times$) 的 AFTMag NGS DNA Clean Beads 磁珠，用移液器吹打或者振荡充分混匀。

5.4.2 放置在室温下孵育 5 min 后，转移到磁力架上室温孵育 2 min 左右。

5.4.3 待溶液澄清后，小心吸走并丢弃上清，注意不要吸走或触碰到磁珠。

5.4.4 使用 200 μL 80%乙醇漂洗磁珠 30 s，然后小心吸走并丢弃乙醇，注意不要吸走或触碰到磁珠。

5.4.5 重复步骤 5.4.4。

5.4.6 将磁珠在室温下晾干 5 min 至磁珠表面不反光即可（磁珠不要过度干燥）。

5.4.7 移走磁力架，在每个样本管中加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，用移液器吹打或者振荡充分混匀，室温孵育 1 min。

5.4.8 将每个样品管放置在磁力架上室温下孵育 2 min，至溶液澄清。

5.4.9 小心吸走 20 μL 上清液，并转移到一个新的 PCR 管。

安全停止点：纯化后的 PCR 产物可以暂时放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周，长期保存需置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，避免反复冻融。

第六步 捕获文库质检

6.1 对捕获后的文库进行定量，记录浓度，计算总量。推荐使用 Qubit 荧光定量仪或 qPCR。

6.2 使用 Agilent 2100 分析仪对捕获后的文库进行峰型质检和平均大小的计算。

6.3 质检后的文库可进行上机测序或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8. 附录

磁珠浓缩法

注 1：磁珠浓缩法因反应体系比真空浓缩法更大，造成更多的试剂损耗，需要额外购买磁珠、Human Cot DNA 等试剂。

注 2：磁珠浓缩法会不可避免地带来部分 DNA 文库损失，建议每个混杂的 DNA 文库投入量增加到 700 ng。

1. AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257) 提前 30 min 从 4°C 拿出，平衡至室温。
2. 将 Blockers 与 Human Cot DNA 放置室温溶解，旋涡振荡混匀并离心，置于冰上备用。
3. 取一个新的 1.5 mL 离心管，配制磁珠纯化后的洗脱液，如下表：

组分	体积
● Hybridization Buffer Enhancer	3.5 μ L
● Blockers	2.6 μ L
Nuclease-Free Water	2.4 μ L
Total Volume	8.5 μ L

4. 取一个新的 1.5 mL 离心管，配制如下多文库混杂体系：

组分	体积
DNA library	700 ng DNA Library each
● Human Cot DNA	7.5 μ L
● AFTMag NGS DNA Clean Beads	上述两项体积的 1.8 倍

5. 将多文库混杂体系和磁珠混合物，在离心管中充分振荡混匀，室温孵育 5 min。
6. 将 1.5 mL 离心管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。
7. 加入 200 μ L 80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

8. 重复步骤 7。

9. 保持离心管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留，磁珠表面不反光即可，不要过度干燥。

10. 将离心管从磁力架上取下，加入步骤 3 中配制好的 8.5 μL 磁珠纯化后洗脱液，重悬磁珠，室温孵育 2 min。

11. 将离心管置于磁力架上静置 2 min，转移 6.5 μL 上清液至一个新 PCR 管中。

12. 向 PCR 管中，按照下表加入其它组分：

组分	体积
磁珠纯化后洗脱产物（步骤 11）	6.5 μL
● 2X Hybridization Buffer	8.5 μL
Capture Probes	2 μL
Total Volume	17 μL

13. 轻轻旋涡混匀后，短暂离心。

14. 将 PCR 管放入提前预热至 95°C 的 PCR 仪中，保持 100°C 热盖，按照下表程序进行杂交反应：

温度	时间
95°C	30 s
65°C	4-16 hr
65°C	Hold

至此已经完成 DNA 文库浓缩、封闭和探针杂交，接下来按照正文 7.操作步骤第三步进行后续链霉亲和素磁珠捕获及洗脱 Buffer 处理即可。

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地
项目一期 5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院
2 号楼 4 楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr, Woburn, MA 01801, United States

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com