

xCapSeq™ DNA 长片段杂交&清洗试剂盒 Pro

操作说明书

(Cat#HC013,Version5.1)

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. 文库与链霉亲和素磁珠结合	11
5. 洗脱未结合 DNA	12
6. 捕获文库 PCR 富集	13
7. 产物纯化（磁珠纯化或筛选纯化）	14

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。

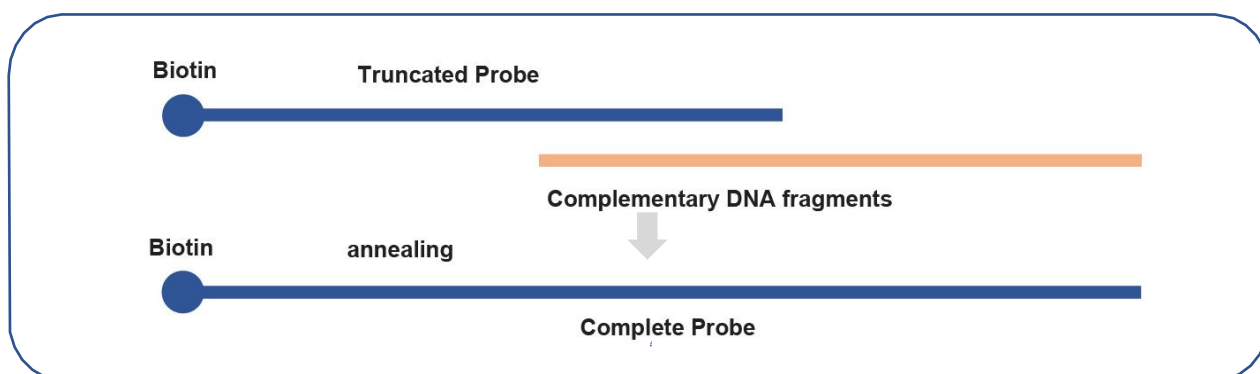


图 1. xCapSeq™ 探针合成示意图

xCapSeq™DNA 长片段杂交&清洗试剂盒 Pro 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 0.5~4 h。同时开创性将洗脱试剂盒合并，仅需一个洗脱试剂即可完成全部洗脱过程，整体仅需 12 分钟即可完成。结合 xCapSeq SA 磁珠的免洗流程，可满足了极速的交付需求。

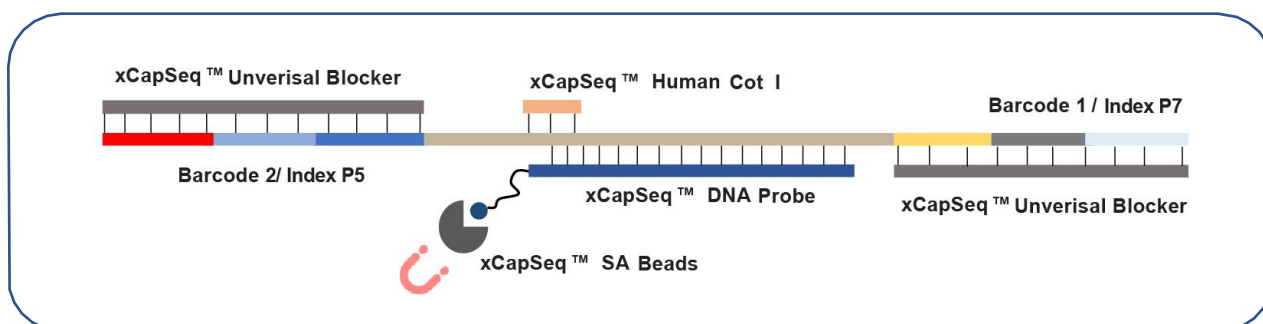


图 2. xCapSeq™ 探针杂交捕获原理图

实验流程

添加 xCapSeq™ LA 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

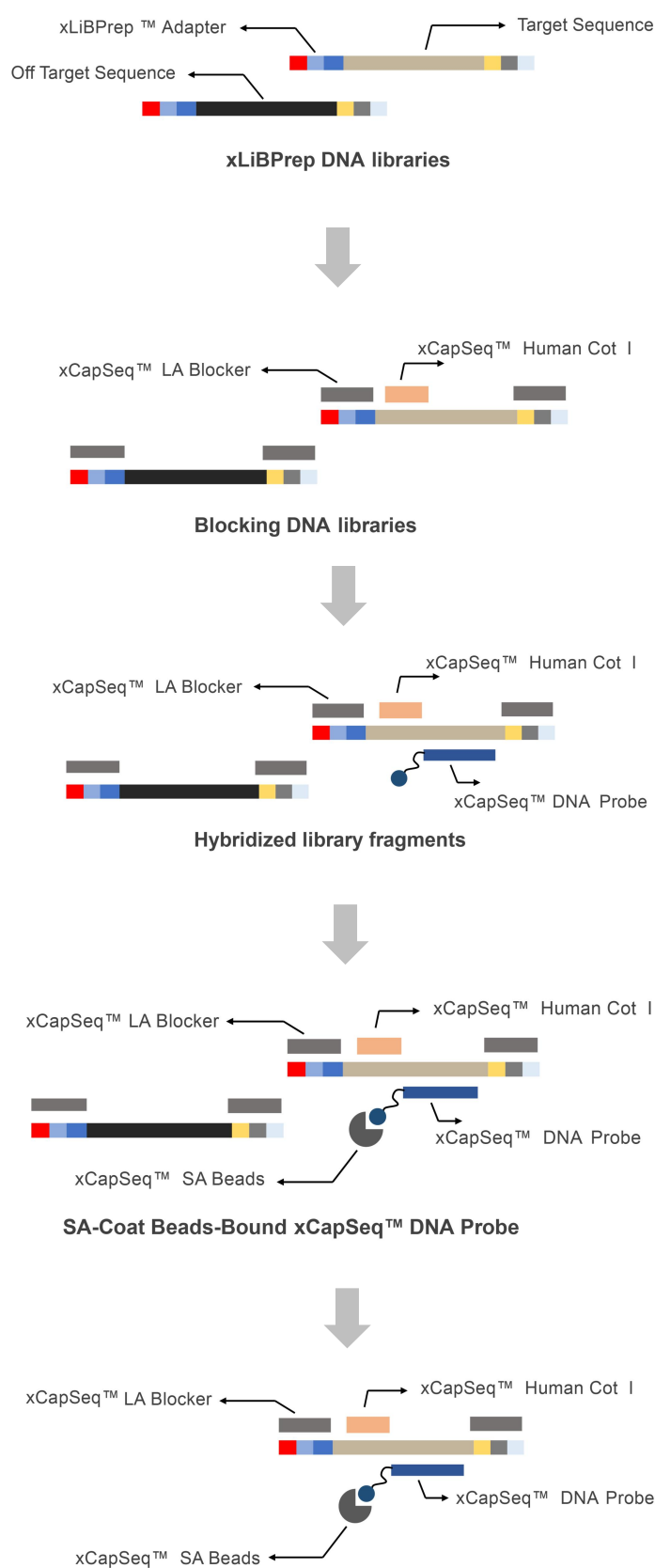


图 3. xCapSeq™ 液相捕获实验流程图

产品组成

主货号：HC013-LA 规格：12 rxns / 96 rxns

产品组分	12 rxns (HC013-012)	96 rxns (HC013-096)
● 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× WB	576 μL	4608 μL
○ xCap 2 × EB	960 μL	7680 μL
● LA 2×HiFi Master Mix	300 μL	2400 μL
● LA Primer	15 μL	120 μL

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™ 长片段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. 1× 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。
8. 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™ Long Read Enzymatics 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。

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#HC006	xCapSeq™ illumina 通用封闭试剂	适用于 illumina 平台 TruSeq DNA 文库的
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
*	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的 DNA 定量系统任选其一即可
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
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

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	200 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	0.5 -10 μ L 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 LA Blocker:


根据文库构建的接头结构选择对应封闭试剂，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 LA Blocker	8 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 6 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：xCap 2× Hyb Buffer 解冻后存在结晶，需 68 °C 加热 2 min 再室温静置，充分溶解后使用。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)
1	95	5
2	68	>240 min *

^ * 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 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。

3.2.1 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 稀释后的 1× WB，置于 68 °C PCR 仪。

3.2.2 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。

4. 文库与链霉亲和素磁珠结合

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

4.2 涡旋振荡 15 sec，充分混匀。

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

4.4 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。

4.5 将步骤 2.4 中在 68 °C 杂交的 16 μL 杂交液全部转移至步骤 4.4 含磁珠的 0.2 mL PCR 管（或八联排 PCR 管）中。

4.6 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。

4.7 在 PCR 仪中继续反应（热盖 75 °C）。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	68	45

4.8 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。

5. 洗脱未结合 DNA

5.1 准备 68 °C洗脱

5.1.1 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。

5.1.2 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。

5.1.3 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。

5.1.4 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。

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

5.1.6 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。

5.2 准备室温洗脱

5.2.1 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。

5.2.2 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离，去上清。

5.2.3 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。

5.2.4 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。

5.3 重悬磁珠

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

5.3.2 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 6.1 的 PCR 扩增。

6. 捕获文库 PCR 富集

6.1 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 (μL)
● LA 2× HiFi Master Mix*	25
● LA Primer*	1.25
磁珠重悬液 (步骤 6.3.2)	23.75
总量	50

⬆️ * LA 2× HiFi Master Mix 及 LA Primer 为 xLiBPreP™ 通用高保真长片段文库扩增试剂盒产品组分。

6.2 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。

6.3 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 (cycles)
预变性	98	1 min	1
变性	98	10 sec	参照下图 *
退火	60	30 sec	
延伸	68	5 min	
完全延伸	68	5 min	1
Hold	4	∞	1

⬆️ * 循环数具体循环数可参考下表：

Target size	4-6 plex	7-12 plex	12-16 plex
>100 Mb	19	_*	_*
50-100 Mb	21	20	19
10-50 Mb	23	22	21
1-10 Mb	24	23	22
500-1000 Kb	26	25	24
100-500 Kb	27	26	25
50-100 Kb	29	28	27
<50 Kb	_*	_*	28

7. PCR 产物纯化

! 注意：提前配制 80%乙醇，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。

7.1 磁珠纯化

7.1.1 向 PCR 反应产物中加 22.5 μ L xPure™ 分选磁珠，涡旋混匀，室温静置 5 min。

7.1.2 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。

7.1.3 加入 200 μ L 现配的 80%乙醇，在磁力架上静置 30 sec，不要吹散磁珠。

7.1.4 去除上清液，将 PCR 管放于瞬时离心机上离心 10 sec，在磁力架上放置 30 sec，用移液器将上清完全去除，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。

7.1.5 加入 25 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。

7.1.6 将 PCR 管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离。

7.1.7 转移洗脱后的文库于新的 PCR 管中。该文库使用 Qubit® 荧光定量仪进行定量后可安排上机测序或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

7.2 筛选纯化

7.2.1 片段筛选磁珠准备。将 xPure™ 分选磁珠室温静置 30 min 左右后充分混匀，按照 xPure™ 分选磁珠：无核酸酶水=7:13 的比例配制片段筛选磁珠备用。

(如配制 1 mL 片段筛选磁珠，需要 350 μ L xPure™ 分选磁珠和 650 μ L 无核酸酶水)

7.2.2 将 PCR 反应产物 50 μ L 转入 1.5mL 离心管中，加入 3.5 \times 体积 (175 μ L) 的片段筛选磁珠，充分吸打混匀 30 sec。

7.2.3 室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器吸弃上清。

7.2.4 加入 200 μ L 现配的 80%乙醇，在磁力架上静置 30 sec，不要吹散磁珠。

7.2.5 去除上清液，将离心管放于瞬时离心机上离心 10 sec，在磁力架上放置 30 sec，用移液器将上清完全去除，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。

7.2.6 加入 25 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。

7.2.7 将离心管置于磁力架上，磁珠与溶液完全分离。

7.2.8 转移洗脱后的文库于新的 PCR 管中。该文库使用 Qubit® 荧光定量仪进行定量后可安排上机测序或 -20 $^{\circ}$ 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

