

DNA 文库杂交捕获 (Illumina® 平台) 操作指南

Version2.3

产品成分说明

Probes 或 Panels

Probes (探针) 是含 5'端生物素修饰的 Oligo, 常用于二代测序中的靶向捕获。多条探针的组合称之为 Panel, 而 Panel 可通过添加额外的定制捕获探针进行优化和扩充, 也可与其他Panel组合使用。探针也可用于补充或改善已有捕获 Panel 表现欠佳的区域。

Universal Blocker for Illumina

Universal Blocker for Illumina是适用于 Illumina 测序平台的通用封阻序列。该产品可与 Illumina 测序平台文库的接头序列结合, 降低接头间的非特异性结合, 藉此提高测序读长的中靶率、增加富集深度。Universal Blocker for Illumina 可用于封闭单端或双端 6 nt 或 8 nt标签的接头文库。

Hybrid Capture Reagents

Hybrid Capture Reagents 是针对上述 Probes 和 Panels 进行靶向捕获杂交洗脱步骤优化的试剂盒。

杂交文库要求

文库制备

以基因组 DNA 为模板, 采用超声打断或者酶切法打断 DNA, 然后使用商品化 DNA 文库构建试剂盒进行文库构建, 采用 Agilent 2100 分析仪对文库峰形进行质检, 以 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。文库分布片段以250-450为主。建议按照测序模式调整样本片段化长度。

文库起始量

针对基因组 DNA, 用于杂交捕获的每个文库推荐量为不低于 500 ng。混合文库建议不超过 4000 ng。

DNA 浓缩

推荐使用真空浓缩仪对 DNA 进行浓缩, 以获取高质量文库样本。

相关设备试剂

捕获试剂

名称	品牌	描述	货号
Probes 或 Panels	Wano Biotechnology		定制/ 商品化
Hybrid Capture Reagents*	Wano Biotechnology	Hybrid Capture Reagents, 8 rxn**	A050108
		Hybrid Capture Reagents, 96 rxn	A050196
Universal Blockers for Illumina	Wano Biotechnology	Universal Blockers for Illumina, 8 rxn	A060108
		Universal Blockers for Illumina, 96 rxn	A060196

* Hybrid Capture Reagents包含cot1 DNA, 链酶亲和素磁珠(Streptavidin Beads)

** Hybrid Capture Reagents, 8 rxn为试用装

自备材料

名称	描述
数字电泳分析系统	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system (Cat # G2939AA) Agilent 2200 或其他同类产品
移液器	*
PCR 基因扩增仪	*
涡旋振荡混匀仪	*
磁力架	*
基于荧光染料法的DNA 定量系统	Thermo Fisher Qubit™ 3.0 Fluorometer (Cat # Q33216)或其它同类产品
真空浓缩仪	Eppendorf Concentrator plus (Cat # 5305000193)或其他同类产品

*常规实验室供应商品牌即可。

其他试剂耗材

名称	描述
乙醇	
TE Solution	10 mM Tris, 0.1 mM EDTA
纯化磁珠	Normal DNA Clean Beads(Wano Cat.#.A020101) 其它同类产品
PCR 扩增体系	PCR 扩增试剂: Wano High-Fidelity Mix for Library (Cat:#A1262196) Kapa Biosystems HiFi HotStart ReadyMix (Cat.#.KK2601) 或其他同类产品 扩增引物: 适配于 Illumina® 测序平台的 P5 和 P7 Primer
Nuclease-Free.Water	

实验流程概况

	步骤	耗时
文库杂交	文库浓缩	取决于实验情况**STOP**
	文库杂交反应	4-16 hr
	↓	
文库洗脱	试剂配制	15.min*
	链霉亲和素磁珠清洗	15.min*
	链霉亲和素磁珠捕获	45.min
	洗脱	30.min
	↓	
	PCR 扩增	30.min
	↓	
	文库纯化和定量	30.min**STOP**

* 可以在文库杂交反应时同时进行操作。

****STOP****安全暂停点：实验可在此步骤暂停，详见实验步骤。

文库杂交捕获

Tube 实验操作模式

Tube 模式适用于最多同时 6 个单管的杂交反应，超过 6 个时建议使用 96 孔板，进行 Plate 模式操作。

步骤一：文库杂交

准备工作

1. 提前取出 Hybrid Capture Reagents 中的杂交试剂 Hyb #1 和 Hyb #2 于室温融解。

注意：Hyb #1 必须充分融解至完全无结晶。如室温无法融解，可于 65°C 水浴中孵育，期间涡旋混匀，直到结晶完全融解（可能数小时）。

2. 如果使用真空浓缩文库方式，请提前打开真空浓缩仪电源预热，调节温度为 60°C。

真空浓缩法

注意：考虑到无偏好性，推荐使用真空干燥的方法浓缩混合文库体系，进入杂交捕获实验。磁珠浓缩法详见附录。

进行多文库混合杂交捕获时，具体的杂交文库混合方法如下表：

组分	加入量	数量
总文库	500ng/文库	1-8
Human Cot1 DNA	5 μ L	
Universal Blockers for Illumina	2 μ L	

提醒：为维持文库的复杂度，推荐每个构建文库总量的 \geq 50% 用于杂交；特殊样本，如 FFPE 来源 DNA、cfDNA 等，推荐原始样本质量同等级的文库进行混杂。

- 按照上表将各组分混合于一个 0.2/1.5 mL 的低吸附离心管中，涡旋混匀，瞬时离心。
- 将离心管放入提前预热至 60°C 的真空浓缩仪中干燥。
- 待全部液体蒸发并完全干燥后，将离心管密封后备用。****STOP**安全暂停点：离心管密封后，可室温保存过夜或 -20°C 长期保存。**
- 取出 309 Gene Plus TMB Panel 冰上自然融解，首次使用后按需小量分装。
- 根据下表配制杂交反应液，使用移液器混合均匀后加入到已经真空浓缩干燥的离心管底部，使用移液器轻柔吹吸混匀 15-20 次，瞬时离心，25 °C 孵育 5-10 min。

组分	加入量
Hyb #1	8.5 μ L
Hyb #2	2.7 μ L
Nuclease Free Water	1.8 μ L
309 Gene Plus TMB Panel	4 μ L
Total	17 μ L

6. 涡旋混匀杂交反应混合液，瞬时离心后，将离心管中的全部 17 μ L 杂交反应混合液转移至一个新的 0.2 mL PCR 管中，瞬时离心，放进 PCR 仪中，启动如下杂交程序：

程序	时间
杂交程序 (热盖 100°C)	
95°C	30 sec
65°C	4-16 hr*
65°C	Hold
洗脱程序 (热盖 70°C) **	
65°C	Hold

注意：** 洗脱程序中热盖温度务必设置为 70°C。

步骤二：文库洗脱准备工作

1. 取出 Hybrid Capture Reagents 中的其他试剂室温自然融解，涡旋混合均匀。

注意：Wash Buffer 1 如果无法融解，可于 65°C 水浴孵育至完全融解。

2. 从4°C取出Streptavidin Beads 涡旋混合均匀，室温平衡 30 min 后方可进行链霉亲和素磁珠的清洗和捕获步骤。

试剂准备

1. 根据下表准备洗脱Buffer:

组分	每反应用量	放置于
Bead Wash Buffer	320 μ L	室温
Stringent wash buffer	320 μ L	等体积分装为 2 管，并加热至 65°C
Wash Buffer 1	280 μ L	分装 110 μ L 并加热至 65°C，其余放置在室温
Wash Buffer 2	160 μ L	室温
Wash Buffer 3	160 μ L	室温

注意：上述两种加热的洗脱 buffer 至少需要在65°C孵育 15 min。

2. 根据下表准备磁珠悬浮液:

组分	加入量
Hyb #1	8.5 μ L
Hyb #2	2.7 μ L
Nuclease Free Water	5.8 μ L
Total	17 μ L

链霉亲和素磁珠清洗

1. 将 Streptavidin Beads 涡旋混匀 15 sec, 确保完全混匀。吸取 50 μ L 磁珠至 1个 1.5mL 低吸附离心管中。

2. 向离心管中加入 100 μ L Bead Wash Buffer, 轻柔吹吸混匀10 次, 瞬时离心, 置于磁力架上数分钟, 待液体完全澄清, 使用移液器移弃上清。将离心管从磁力架上移出。

3. 重复步骤 2 两次。

4. 向离心管中加入17 μ L 磁珠悬浮液, 轻柔吹吸混匀, 将全部磁珠悬浮液转移至1个新的 0.2 mL 低吸附 PCR 管中。

5. 将含有悬浮捕获磁珠的0.2 mL PCR管放入PCR仪 65°C, 孵育 5 min。

链霉亲和素磁珠捕获

1. 4–16 hr 杂交反应后, 调节 PCR 仪进入到洗脱程序。

提醒：如果 PCR 仪不能分步设置热盖, 可提前打开另外一台 PCR 仪运行洗脱程序, 将杂管转移至新的 PCR 仪上。

2. 将重悬的链霉亲和素磁珠加入到杂交体系中, 并使用移液器轻柔吹吸混匀或涡旋混匀。

提醒：此步骤务必使用低吸附吸头; 操作要迅速。

3. 65°C 孵育45min, 每 8–12 min 轻柔涡旋一次, 确保磁珠完全重悬。

热洗脱

注意：热洗脱过程操作要迅速; 吹吸混匀过程中尽量避免产生气泡。

1. 孵育结束后从 PCR 仪上取下 PCR 管, 并向其中加入 100 μ L 65°C Wash Buffer 1, 吹吸混匀含有磁珠的杂交体系。

2. 将 PCR 管置于磁力架上 1 min, 待液体完全澄清后, 使用移液器吸取移弃上清。

3. 将 PCR 管从磁力架上移出, 加入150 μ L 65°C Stringent wash buffer, 轻柔吹吸10 次混合均匀, 立即将 PCR 管置于磁力架上 1 min, 待液体完全澄清后, 使用移液器吸取移弃上清。

4. 重复步骤 2 和 3 一次。

室温洗脱

1. 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入150 μL 室温 Wash Buffer 1，涡旋确保充分混匀。
2. **立即**将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入150 μL 室温 Wash Buffer 2，涡旋确保充分混匀。
3. **立即**将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入150 μL 室温 Wash Buffer 3，涡旋确保充分混匀。
4. **立即**将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 1min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，之后换用 10 μL 吸头移去少量残余 Buffer。
5. 将 PCR 管从磁力架上移出，加入 22.5 μL Nuclease Free Water，使用移液器轻柔吹吸 10 次，确保混合均匀，转移全部液体至一个新的 0.2 mL PCR 管中。

注意：包括磁珠，千万不要丢弃磁珠。

步骤三：PCR 扩增

注意：此步骤PCRwano High-Fidelity Mix for Library 为例，若更换其他扩增酶请相应调整扩增程序

1. 取出2X PCR 扩增试剂 和 Primer Mix 于冰上自然融解，使用移液器或旋涡混匀仪轻柔混合均匀，瞬时离心备用。按照以下体系在置于冰上的 PCR 管中进行反应体系配制：

组分	加入量
2X PCR 扩增试剂	25 μL
Primer Mix	2.5 μL
带捕获 DNA 的磁珠	22.5 μL

3. 将 PCR 管放入 PCR 仪中启动以下程序，热盖温度设定为 105 $^{\circ}\text{C}$ ：

程序	时间	循环数
98 $^{\circ}\text{C}$	1 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	4-15* 循环数见下表
60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

提醒：请根据样本类型、Panel 大小、杂交时间和混合文库总量调整扩增循环数。

Panel大小	推荐循环数量		
	1杂 (500ng)	4杂 (2000ng)	8杂 (4000ng)
>10 Mb	10cycle	8cycle	6cycle
1 Mb-10 Mb	12cycle	10cycle	9cycle
50 kb-1 Mb	13cycle	11cycle	10cycle
1 kb -50 kb	14cycle	12cycle	11cycle

步骤四：文库纯化和定量

提醒：使用新鲜配制的 80% 乙醇。

1. PCR 扩增完成后，取出 PCR 管并置于磁力架上 2 min，待液体完全澄清后，将上清转移至一个新的 0.2 mL PCR 管中。
2. 向 PCR 管中加入 60 μ L 的 **Normal DNA Clean Beads** 纯化磁珠，使用移液器或涡旋混匀仪混合均匀，25 $^{\circ}$ C 孵育 5 – 10 min。
3. 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 5 min，待液体完全澄清后，使用移液器吸取移弃上清。
4. 沿 PCR 管侧壁缓慢加入 150 μ L 80% 乙醇，注意勿扰动磁珠，静置 1 min，使用移液器吸取移弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上，使用 10 μ L 吸头移去少量残留乙醇，注意勿吸到磁珠。
7. 打开 PCR 管管盖，并于室温静置约 2–5 min，至乙醇挥发完全。

提醒：切勿过分干燥，否则影响最终得率。

8. 将 PCR 管从磁力架上移出，加入 20–22 μ L TE Solution，使用移液器或涡旋混匀仪将磁珠悬浮均匀，25 $^{\circ}$ C 孵育 2–5 min。
9. 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上 1–2 min，待液体完全澄清后，使用移液器小心将上清转移至一个新的 0.2 mL PCR 管或 1.5 mL 离心管中进行保存，注意勿吸到磁珠。
10. 对文库进行基于荧光染料方法定量 (Qubit) ；分析文库片段分布 (Agilent 2100 Bioanalyzer 或同类产品) 。

****STOP**安全暂停点：纯化后的 PCR 产物可 -20° C 保存一周。**

Plate 实验操作模式

提醒：推荐单次实验操作不超过 32 个杂交反应。

步骤一：文库杂交

准备工作

1. 提前取出 Hybrid Capture Reagents 中的杂交试剂 Hyb #1 和 Hyb #2 于室温融解。

注意：Hyb #1 必须充分融解至完全无结晶。如室温无法融解，可于 65°C 水浴中孵育，期间涡旋混匀，直到结晶完全融解（可能数小时）。

2. 提前确认 96 孔板的密封膜效果，否则杂交过程中过量蒸发可能导致实验失败。请参考“注意事项-文库杂交”。

3. 如果使用真空浓缩文库方式请提前打开真空浓缩仪电源预热，调节温度为 60°C。

真空浓缩法

注意：考虑到无偏好性，推荐使用真空干燥的方法浓缩混合文库体系，进入杂交捕获实验。磁珠浓缩法详见附录。

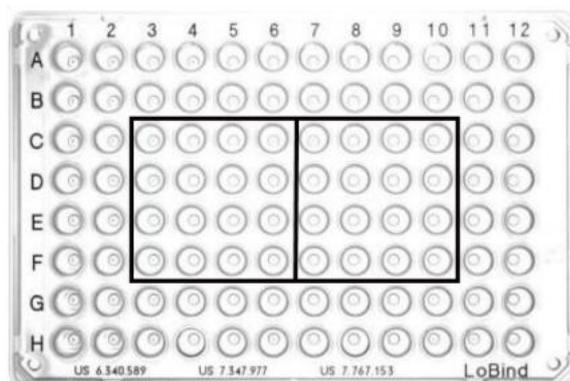
进行多文库混合杂交捕获时，具体的杂交文库混合方法，如下表：

组分	加入量	数量
总文库	500 ng/文库	1-8
Human Cot1 DNA	5 μ L	
Universal Blockers for Illumina	2 μ L	

提醒：确保每个构建文库总量的 $\geq 50\%$ 用于杂交；特殊样本，如 FFPE 来源 DNA、cfDNA 等，推荐原始样本质量同等级的文库进行混杂。

1. 按照上表将各组分混合并加入到低吸附 96 孔板的每个孔中，做好标记。

注意：为避免可能的蒸发，尽量使用中间孔。对加样孔做好标记，因干燥浓缩后的液体肉眼不可见。



2. 将 96 孔板放入提前预热至 60°C 的真空浓缩仪中干燥。

3. 待全部液体蒸发并完全干燥后，将 96 孔板密封后备用。

****STOP**安全暂停点：96 孔板密封后，可室温保存过夜或 -20°C 长期保存。**

4. 取出 309 Gene Plus TMB Panel 在冰上自然融解，首次使用后可小量分装。

5. 根据下表配制杂交反应液（乘以反应数，并多配制 10% 富余量），充分涡旋或者吹吸混合均匀，瞬时离心，向每个含有已浓缩干燥的 DNA 文库孔中加入 17 μ L 杂交反应液，使用密封膜将 96 孔板密封，25°C 孵育 5-10 min。

组分	加入量
Hyb #1	8.5 μ L
Hyb #2	2.7 μ L
Nuclease Free Water	1.8 μ L
309 Gene Plus TMB Panel	4 μ L
Total	17 μ L

6. 涡旋 96 孔板确保完全混合均匀，瞬时离心后，将 96 孔板放进 PCR 仪中，启动如下杂交程序：

程序	时间
杂交程序 (热盖 100°C)	
95°C	30 sec
65°C	4-16 hr
65°C	Hold
洗脱程序 (热盖 70°C) **	
65°C	Hold

提醒: ** 洗脱程序中热盖温度务必设置为 70°C。

步骤二：文库洗脱

准备工作

1. 取出 Hybrid Capture Reagents 中的其他试剂室温自然融解，涡旋混合均匀。

注意： Wash Buffer 1 如果无法融解，可于 65°C 水浴孵育至完全融解。

2. 从 4 °C 取出 Streptavidin Beads 涡旋混合均匀，室温平衡 30 min 后方可进行链霉亲和素磁珠的清洗和捕获步骤。

试剂准备

1. 根据下表准备洗脱 Buffer (乘以反应数，并多配制 10% 富余量)：

组分	每反应用量	放置于
Bead Wash Buffer	320 μL	室温
Stringent wash buffer	320 μL	等体积分装为 2 管，并加热至 65°C
Wash Buffer 1	280 μL	分装 110 μL 并加热至 65°C，其余放置在室温
Wash Buffer 2	160 μL	室温
Wash Buffer 3	160 μL	室温

注意： 上述两种加热的洗脱 buffer 至少需要在 65°C 孵育 15 min。

另取 1 个新的 96 孔板 (此处以 32 个反应为例，进行分装和标记示例。具体实验根据反应数调整)，按照以下方式将对应 Buffer 分配至 96 孔板

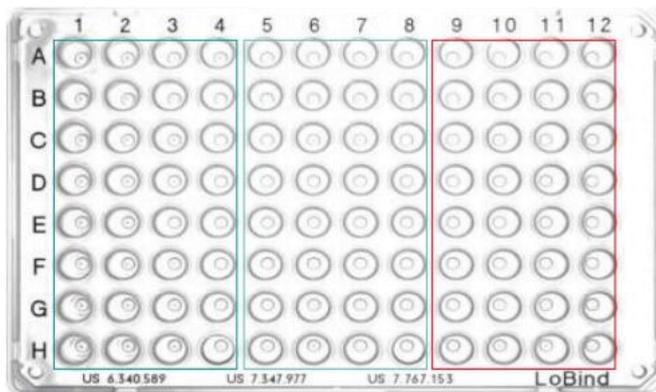
中，预热至 65°C 备用。

1-4 列： 110 μL Wash Buffer 1

5-8 列： 160 μL Stringent wash buffer

9-12 列： 160 μL Stringent wash buffer

注意： 剩余的 Wash Buffer 1 不要丢弃，将用于后续室温洗脱实验操作中。



2. 根据下表准备磁珠悬浮液（乘以反应数，并多配制 10% 富余量）：

组分	加入量
Hyb #1	8.5 μL
Hyb #2	2.7 μL
Nuclease Free Water	5.8 μL
Total	17 μL

链霉亲和素磁珠清洗

1. 将 Streptavidin Beads 涡旋混匀 15 s，确保完全混匀。吸取 50 μL 磁珠至 1 个新的 96 孔板中，每个捕获反应对应 1 个孔。
2. 向对应孔中加入 100 μL Bead Wash Buffer，使用移液器吹吸 10 次混匀。将 96 孔板放置于磁力架上 1–2 min 至液体完全澄清，使用移液器吸取移弃上清。将 96 孔板从磁力架上移出。
3. 重复步骤 2 两次。
4. 向对应孔中加入 17 μL 磁珠悬浮液，使用移液器吹吸混匀。
5. 将含有悬浮捕获磁珠的 96 孔板密封后，放入 PCR 仪 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。

链霉亲和素磁珠捕获

1. 4–16 h 杂交反应后，调节 PCR 仪进入到洗脱程序。

提醒：如果 PCR 仪不能分步设置热盖，可提前打开另外一台 PCR 仪运行洗脱程序，将杂交转移至新的 PCR 仪上。

2. 打开 PCR 仪，揭开 96 孔板的密封膜，将重悬的链霉亲和素磁珠加入到杂交体系中，并使用移液器轻柔吹吸混匀，使用 1 张新的密封膜将 96 孔板密封，盖上热盖。

提醒：此步骤使用低吸附吸头；操作要迅速，可用排枪操作。

3. 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min，每 10–12 min 轻微涡旋一次，确保磁珠完全重悬。

注意：每次打开密封膜后，再次密封均需使用新的密封膜。

热洗脱

注意：热洗脱过程操作要迅速；吹吸混匀过程中尽量避免产生气泡。

1. 孵育结束后从 PCR 仪上取下 96 孔板，并向其中加入 100 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ Wash Buffer 1，使用移液器轻柔吹吸 10 次混匀。

2. 重新密封装有洗脱 Buffer 的 96 孔板，盖上 PCR 仪热盖。

3. 将 96 孔板置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清，使用移液器移弃上清。

4. 将 96 孔板从磁力架上取下，加入 150 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ Stringent wash buffer，轻柔吹吸 10 次混匀，使用 1 张新的密封膜将 96 孔板密封，放进 PCR 仪中 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。

5. 重复步骤 3 和 4 一次。

室温洗脱

1. 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入 150 μL 室温 Wash Buffer 1，使用一张新的密封膜将 96 孔板密封，室温孵育 2 min，期间涡旋混匀 30 sec 后静置 30 sec，交替进行，确保充分混匀。

2. 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入 150 μL 室温 Wash Buffer 2，使用一张新的密封膜将 96 孔板密封，室温孵育 2 min，期间涡旋混匀 30 sec 后静置 30 sec，交替进行，确保充分混匀。

3. 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，加入 150 μL 室温 Wash Buffer 3，使用一张新的密封膜将 96 孔板密封，室温孵育 2 min，期间涡旋混匀 30 sec 后静置 30 sec，交替进行，确保充分混匀。

4. 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 1 min，待液体完全澄清后吸取移弃上清，之后换用 10 μL 吸头移去少量残余 Buffer。

5. 将 96 孔板从磁力架上移出，加入 22.5 μL Nuclease Free Water，使用移液器吹吸 10 次混匀。

注意：包括磁珠，千万不要丢弃磁珠。

步骤三：PCR 扩增

1. 取出Wano High-Fidelity Mix for Library 和 Primer Mix 于冰上自然融解，使用移液器或涡旋混匀仪轻柔混合均匀，瞬时离心备用。

注意：此步骤PCR 以Wano High-Fidelity Mix for Library 为例，若更换其他扩增酶请相应调整扩增程序

2. 按照以下体系在置于冰上的离心管中进行反应体系配制（乘以反应数，并多配制 10% 富余量）：

组分	加入量
2X PCR 扩增试剂	25 μ L
Primer Mix	2.5 μ L
带捕获 DNA 的磁珠	22.5 μ L

3. 将 27.5 μ L 反应液加入到每个含有 22.5 μ L 磁珠的 96 孔板孔中，充分涡旋混匀，瞬时离心。

4. 将 96 孔板放入 PCR 仪中启动以下程序，热盖温度设置为 105 $^{\circ}$ C：

程序	时间	循环数
98 $^{\circ}$ C	1 min	1
98 $^{\circ}$ C	10 sec	4-15* 循环数见下表
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	5 min	
4 $^{\circ}$ C	Hold	

提醒：请根据样本类型、Panel 大小、杂交时间和混合文库总量调整扩增循环数。

Panel大小	推荐循环数量		
	1杂 (500ng)	4杂 (2000ng)	8杂 (4000ng)
> 10 Mb	10 cycle	8 cycle	6 cycle
1 Mb-10 Mb	12 cycle	10 cycle	9 cycle
50 kb-1 Mb	13 cycle	11 cycle	10 cycle
1 kb -50 kb	14 cycle	12 cycle	11 cycle

步骤四：文库纯化和定量

提醒：此处纯化体系以 Normal DNA Clean Beads 为例，也可使用其他同类产品。

1. PCR 扩增完成后取出 Normal DNA Clean Beads 需要提前取出，涡旋混合均匀，室温平衡至少 30.min 后方可使用。使用新鲜配制的 80% 乙醇。96 孔板置于磁力架上 2 min，待液体完全澄清，用移液器将上清转移至 1 个新的 96 孔板中。

2. 向 96 孔板加入 60 μ L 的 Normal DNA Clean Beads，使用移液器或涡旋混匀仪混合均匀，25 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min。

3. 将 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 2-5.min，待液体完全澄清，使用液器吸取移弃上清。

4. 沿 96 孔板每个孔的侧壁缓慢加入 150 μ L 80% 乙醇，注意勿扰动磁珠，静置 30 s，使用移液器吸取移弃上清。

5. 重复步骤 4 一次。

6. 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上，使用 10 μ L 吸头移去少量残留乙醇，注意勿吸到磁珠。

7. 去除 96 孔板密封膜，并于室温静置 2-5 min，至乙醇挥发完全。

提醒：切勿过分干燥，否则影响最终得率。

8. 将 96 孔板从磁力架上移出，加入 20-22 μ L TE Solution，使用移液器或涡旋混匀仪将磁珠悬浮均匀，25 $^{\circ}$ C 孵育 5.min。

9. 将 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 1-2 min 至液体完全澄清，使用移液器小心将上清转移至一个新的 96 孔板中，注意勿吸到磁珠。

10. 对文库进行基于荧光染料方法定量 (Qubit)；分析文库片段分布 (Agilent 2100 Bioanalyzer或同类产品)。

****STOP**安全暂停点：纯化后的 PCR 产物可 -20 $^{\circ}$ C保存一周。**

注意事项

温度控制

- 杂交捕获洗脱过程中 Buffer 温度不同，请严格按照说明进行操作。
- 杂交过程热盖温度设置，请严格按照说明进行操作。
- 实验室内环境温度必须稳定在 20–25°C，温度过低影响捕获洗脱实验操作的稳定性。

杂交捕获操作模式

- 大多数情况下推荐使用 Plate 模式，实验重复性好，可实现高通量操作，节省时间。
- 少量杂交反应（≤6）或重要样本，推荐使用 Tube 模式，实验操作相对容易。

文库浓缩方法

- 推荐使用真空浓缩法，可获得最佳质量的杂交文库。
- 磁珠浓缩法速度快、通量高，但请注意此方法会产生轻微的 GC 偏好（详情见附录）。

文库杂交

- DNA 文库应避免含有游离接头或接头二聚体，否则将影响文库混合准确性，进而影响数据产出均衡性。
- 多个样本混合捕获实验中的基因组 DNA 样本的文库构建，建议采用片段双筛，有助均衡数据的产出。
- 杂交 Buffer 必须充分融解无结晶，文库混合液必须完全蒸干，否则杂交体系的不准确将影响文库捕获效率。
- 建议提前对杂交损耗进行测试：使用蒸馏水替代杂交体系进行测试，65°C 12h 损失应 < 0.5 μL，确保 PCR 管及 96 孔板的密封性。

耗材

- 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。

文库杂交：磁珠浓缩法（可选）

提醒：磁珠浓缩法因反应体系比真空浓缩法增加，需要额外购买磁珠 Human Cot1 DNA 等试剂。

Normal DNA Clean Beads 需要提前取出，涡旋混合均匀，室温平衡至少 30 min 后方可使用。使用新鲜配制的 80% 乙醇。

多文库混合杂交捕获时，具体的杂交文库混合方法如下表：

组分	加入量	数量
总文库	500 ng/文库	1-8
Human Cot1 DNA	7.5 μ L	
磁珠	上述体积1.8倍	

- 按照上表将各组分混合于 1.5 mL 的低吸附离心管或 96 孔板中。若使用 96 孔板需要使用密封膜密封。
- 涡旋混匀，25°C 孵育 10 min。
- 将离心管或 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 2-5 min。至液体完全澄清，使用移液器吸取移弃上清。
- 沿离心管或孔壁缓慢加入超过纯化体系体积的 80% 乙醇，注意勿扰动磁珠，静置 30 sec，使用移液器吸取移弃上清。
- 重复步骤 4 一次。
- 离心管或 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上，使用 10 μ L 吸头移去少量残留乙醇，注意勿吸到磁珠。
- 将磁珠于室温静置干燥 2-5 min，至乙醇挥发完全。

提醒：切勿过分干燥，否则影响最终得率。

- 按照下表配制杂交反应混合液，加入到离心管或 96 孔板中：

组分	加入量
Hyb #1	9.5 μ L
Hyb #2	3 μ L
Universal Blockers for Illumina	2 μ L
309 Gene Plus TMB Panel	4.5 μ L
Total	19 μ L

- 涡旋将磁珠和杂交反应液充分混合均匀，室温孵育 5 min。
- 将离心管或 96 孔板瞬时离心后置于磁力架上 5-10 min 至液体完全澄清，使用移液器转移 17 μ L 上清至新的 0.2 mL PCR 管或 96 孔板。
- 按 Tube 实验操作模式步骤一：文库杂交 - 真空浓缩法（第 4 页），或 Plate 实验操作模式步骤一：文库杂交-真空浓缩法（第 8 页），继续文库杂交捕获反应。