

# Hieff NGS<sup>®</sup> Hyb & Wash Kit

## 捕获杂交清洗试剂盒

12245ES

---

产品使用说明书

Ver. CN20230506

# 目录

产品简介 .....	1
产品信息 .....	1
组分信息 .....	1
储存条件 .....	1
注意事项 .....	1
使用说明 .....	2

## 产品简介

Hieff NGS® Hyb & Wash Kit 是专门针对翌圣靶向捕获系列产品开发的捕获杂交清洗试剂, 搭配新型双链 RNA 探针(120-mer) 将目标 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序, 精心优化的一管式杂交缓冲液体系能得到更稳定且更优异的捕获效果。NGS 靶向捕获试剂盒凭借卓越的产品性能, 更好的灵敏度及特异性, 广泛应用于新型分子诊断与检测等领域的研究。试剂盒中提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证, 最大程度上保证了实验的稳定性和重复性。

## 产品信息

货号	12245ES04 / 12245ES16 / 12245ES96
规格	4 T / 16 T / 96 T

## 组分信息

组分编号		组分名称	12245ES04	12245ES16	12245ES96
BOX-I	12245-A	Wash Buffer 1	3.2 mL	12.8 mL	76.8 mL
	12245-B	Wash Buffer 2	800 $\mu$ L	3.2 mL	19.2 mL
	12245-C	Wash Buffer 3	2.8 mL	11.2 mL	67.2 mL
BOX-II	12245-D	2 $\times$ Hyb Buffer	72 $\mu$ L	290 $\mu$ L	1.73 mL
	12245-E	RNase Inhibitor	2 $\mu$ L	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	12245-F	Post PCR Mix	100 $\mu$ L	400 $\mu$ L	2.4 mL

## 储存条件

BOX-I: 室温保存, 有效期 1 年。

BOX-II:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$  保存, 有效期 1 年。

## 注意事项

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 对于 FFPE 样本, 由于样本降解程度不同, 建议不与其他样本类型一起进行捕获。
3. 预文库质控: 将已准备好的 DNA 预文库使用 Qubit 准确测定浓度, 并使用 1% 的琼脂糖电泳或自动化毛细管电泳进行质控评估。文库主峰大约在 300-400 bp, 预文库总量一般为 1-2  $\mu$ g 左右。
4. 需保证所使用 PCR 管, 96 孔板或 8 连管和盖子或膜的密封性以及和 PCR 仪器的适配性, 在第一次实验前必须做密封性检测实验。建议在待测管中加入 36  $\mu$ L Nuclease-free Water, 盖严压紧后在热盖模式下  $65^{\circ}\text{C}$  过夜, 用移液器去除剩余液体, 确保体积不低于 30  $\mu$ L, 管子和盖子不变形。
5. 使用前请核对预文库的接头类型, 选择对应的 Blockers; 如使用的 Blockers 与预文库接头类型不匹配, 将造成捕获文库的中靶率降低、杂交捕获反应失败。
6. 杂交和清洗过程中需严格控制温度, 如温度控制不准确, 可能导致捕获文库的中靶率及均一度降低。
7. 磁珠浓缩预文库可能导致 GC 偏好, 推荐使用真空浓缩仪对预文库进行浓缩。
8. 在漂洗链霉亲和磁珠后, 使用 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 重悬磁珠, 切勿丢弃磁珠。
9. 本产品仅作科研用途!

## 使用说明

### 一、自备材料

#### 1. 配套试剂

货号	名称	备注
13577ES	Hieff NGS® DNA Library Prep Kit	机械法预文库制备
12195ES	Hieff NGS® OnePot Pro DNA Library Prep Kit V2	酶切法预文库制备
12244ES	Hieff NGS® Human All Exon Probes	人全外显子探针
12246ES	Hieff NGS® Universal Blocking Oligo (with cot-1)	接头封阻剂
12247ES	Hieff NGS® Universal Post PCR Primer for Illumina	扩增引物
12248ES	Hieff NGS® Hyper Enrichment Beads	捕获磁珠
12601ES	Hieff NGS® DNA Selection Beads	纯化磁珠
12642ES	1×dsDNA HS Assay Kit	测定捕获后终文库浓度

#### 2. 其他材料

无水乙醇、Nuclease-free Water、Low TE (pH 8.0)；

200 μl 低吸附 PCR 管、8 连管、96 孔板、1.5 ml 低吸附 Nuclease-free 离心管、磁力架；

#### 3. 配套仪器

真空浓缩器、PCR 仪、金属浴、垂直旋转仪、涡旋振荡仪、微型离心机、Qubit 定量仪、移液器、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。

### 二、操作流程

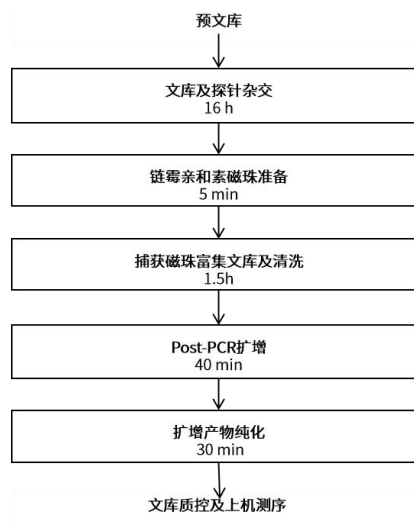


图 1 杂交捕获实验流程图

### 三、操作步骤

#### 1. 样本及探针杂交

1.1 从-20 °C 冰箱取出 Hieff NGS® Hyb & Wash Kit Box-II 和 Hieff NGS® Universal Blocking Oligo (with cot-1)，并取出-80 °C 冰箱保存的 Probes。2 × Hyb Buffer 放置于 65 °C 金属浴中预热。Probes、RNase Inhibitor 和 Universal Blocking Oligo (with cot-1) 放置于冰上融化。其余组分放回冰箱保存。

1.2 根据 Qubit 浓度，将 1-6 个预文库等量混合到一个新的 PCR 管，8 连管或 96 孔板中（建议使用 96 孔板或 8 连管做，如

果使用单管则需要在杂交过程中的 PCR 仪上该单管四周放置 4 个空 PCR 管进行支撑，避免变形）。具体用量参考表 1，确保每个预文库所用的 Index 是唯一的。对于 cfDNA、FFPE 样本或其他质量较差的样本建议采用 1 个预文库单独进行杂交捕获，并取全部的文库进入杂交过程。

**【注】** Qubit 浓度为较精确的检测，浓度定量的误差可能导致测序时数据产量的不均一。

表 1 预文库 Pooling

每个 Pool 包含的预文库数	每个 Index 文库的量	Pool 的总量
1	750 ng	750 ng
2	500 ng	1000 ng
3	500 ng	1500 ng
4	500 ng	2000 ng
5	500 ng	2500 ng
6	500 ng	3000 ng

1.3 若根据上表计算的预文库投入量体积不超过 5  $\mu\text{L}$ ，直接补水至 5  $\mu\text{L}$ 。若预文库投入体积超过 5  $\mu\text{L}$ ，则需使用浓缩干燥仪进行浓缩，浓缩温度不超过 45 $^{\circ}\text{C}$ 。将离心管放入离心浓缩仪。打开 PCR 管盖，启动离心浓缩仪，开始浓缩。根据离心浓缩仪的型号不同，干燥时间 5-15 min 不等，注意观察。干燥后加入 5  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分震荡混匀，离心后静置备用。

**【注】** 不能过分干燥，否则会造成 DNA 溶解困难。若无浓缩干燥仪设备，可以采用附件 1 的磁珠浓缩富集的替代方案。但会引起文库的少量损失。

1.4 取新的 1.5 mL 离心管或 0.2 mL PCR 管放置于常温管架上进行杂交混合液的配制。对于全外显子的 Panel 探针杂交体系配制参考表 2。从 65  $^{\circ}\text{C}$  金属浴上取下 2  $\times$  Hyb Buffer，观察底部确保其澄清透明无沉淀。按照表格中的体积和样本量计算，依次加入其他试剂，然后上下颠倒 2 次后使用旋涡混匀仪震荡 2 s 混匀，快速离心 5 s 将管壁液体离心至管底，配制成单个或多个杂交混合液，放置于常温备用。

**【注】** 2  $\times$  Hyb Buffer 比较粘稠，需要缓慢吸取。不要在冰上配制杂交混合液。对于多个杂交建议按照每个组分体积乘以实际杂交反应数再乘以 1.2 倍配制混合液。

表 2 全外显子的 Panel 探针杂交体系配制

名称	1 次反应体积 ( $\mu\text{L}$ )	8 次反应体积 ( $\mu\text{L}$ )	16 次反应体积 ( $\mu\text{L}$ )
Universal Blocking Oligo (with cot-1)	7.5	72	144
2 $\times$ Hyb Buffer	18	172.8	345.6
RNase Inhibitor	0.5	4.8	9.6
Human All Exon Probes	5	48	96
Total	31	297.6	595.2

1.5 将配制好的杂交混合液按照每个反应 31  $\mu\text{L}$  加入到步骤 1.3 的 5  $\mu\text{L}$  预文库中，并使用移液器轻轻吹打混匀 8 次（注意吹打过程时移液器下压到取液量程 2/3 左右然后松开，反复 8 次，避免全部按压到底产生气泡）。用管盖或 96 孔板密封膜密封，快速离心 5 s。将预文库杂交混合液放置于杂交用的 PCR 仪上。

**【注】** 确保彻底密封，建议使用压盖器或压膜刮板。

1.6 设定表 3 所示反应程序，热盖模式（105 $^{\circ}\text{C}$ ），设定体积 40  $\mu\text{L}$ （杂交总体积 36  $\mu\text{L}$ ）。

表 3 杂交 PCR 程序

温度	时间
热盖 105 ° C	0n
95 ° C	30 s
65 ° C	Hold

1.7 运行表 3 的 PCR 程序，65 ° C 杂交 16 h。

**【注】**杂交 15 - 20 h 不影响下游捕获性能，一般可以考虑第一天下午 4 - 5 时做上杂交，第二天上午 8 - 9 时进行杂交后捕获。

## 2. 链霉亲和素磁珠准备

2.1 捕获前，先从 4 ° C 冰箱取出 Hieff NGS® Hyper Enrichment Beads，在漩涡震荡器上震荡 30 s 至磁珠充分重悬后，室温平衡 30 min 以上。

2.2 在室温平衡 30 min 期间，从常温的 Hieff NGS® Hyb & Wash Kit Box-I 中取出 Wash Buffer 1, Wash Buffer 2 和 Wash Buffer 3，在另外一台 PCR 仪上，设置 65 ° C Hold，热盖程序点击开启（热盖设定为 70 ° C）。放入多个 8 连管或 96 孔板到 PCR 仪上，根据杂交反应数，每个反应准备 3 管 Wash Buffer 3。按照每个孔 170 μL Wash Buffer 3 加入 8 连管或 96 孔板，盖好管盖并确保密封，备用。

**【注】**如果没有足够的 PCR 仪，可以采用金属浴或水浴锅代替，但务必用标准温度计测量以确保温度非常准确，如果温度低于 65°C 会导致捕获效率下降。

2.3 室温平衡 30 min 后，再将 Hieff NGS® Hyper Enrichment Beads 在漩涡震荡器上震荡 30 s 重悬，向 8 连管的每个孔中加入 50 μL Hieff NGS® Hyper Enrichment Beads，注意加到管底位置，避免沾到管壁和管盖部分。

2.4 然后向每个孔加入 150 μL 的 Wash Buffer 1，用 8 连排移液器轻轻吹打 8 次，充分混匀磁珠。

2.5 放置于磁力架上静置澄清后弃掉上清液。如果管壁或管盖有沾到磁珠，则快速离心 5 s 甩至管底。

**【注】**确保全部磁珠在管底侧壁，吸取过程移液器枪头从磁力架对侧贴近管壁逐渐向下吸取，直至管底。避免吸上清过程吸入磁珠。

2.6 重复操作步骤 2.4 - 2.5，Wash Buffer 1 总共清洗 3 次，最后吸走上清液，仅保留磁珠在管底。

2.7 最后每个孔加入 150 μL 的 Wash Buffer 1 重悬磁珠，在每个孔上标记对应的杂交样本名称，室温放置待用。

## 3. 捕获磁珠富集文库及清洗

3.1 杂交混合液 65 ° C 孵育 16 h 后，确保剩余杂交体系体积不低于 20 μL，在 PCR 仪上打开 PCR 管、8 连管或 96 孔板，用 8 连排移液器将准备好的 150 μL 磁珠重悬液加入到杂交混合液中，并使用移液器轻轻吹打 8 次。然后将包含磁珠和杂交体系的混合液全部转移至 2.7 步骤中标记的磁珠 8 连管中，注意杂交管上的标记和磁珠管上的标记一一对应。

**【注】**不要从 PCR 仪上拿下杂交混合液。温度的下降会导致捕获效率降低。

3.2 将上述磁珠杂交混合液从 PCR 仪上取下放置在垂直旋转仪上并固定好，室温旋转孵育 30 min。也可以用震荡金属浴，设置为 1000-1500 r/min 进行室温震荡孵育。

**【注】**取下杂交混合液后 PCR 仪不要关闭，保持 65 ° C，后续步骤的 Wash buffer3 孵育清洗时需用。

3.3 从 -20 ° C 冰箱取出 Hieff NGS® Hyb & Wash Kit Box-II 和 Universal Post PCR Primer for Illumina，找到 Post PCR Primer for Illumina 和 Post PCR Mix 放置于冰上融化。

3.4 30 min 后从旋转仪或震荡金属浴上取下 8 连管，快速离心 5 s，放置磁力架 2-5 min，确保液体清澈，吸弃上清。

3.5 从磁力架上取下 8 连管，每个孔加入 150 μL 的 Wash Buffer 2 来重悬磁珠，移液器轻轻吹打 10 次，室温孵育 15 min，每间隔 5 min，上下快速颠倒 15 次。

3.6 Wash Buffer 2 室温孵育完成后，快速离心 5 s 后放置在磁力架上待液体清澈后，吸弃上清液，放置在 65 ° C 杂交用的 PCR 仪上，立即用 8 连排移液器加入 150 μL 的已预热好的 Wash Buffer 3，在 PCR 仪上吹吸 10 次使磁珠充分混匀，盖上管盖 65 ° C 孵育 10 min。

【注】吸取上清后需要快速加入 Wash Buffer 3，磁珠不能干燥。

3.7 65 °C 孵育 10 min 后，从 PCR 仪中取出反应管并放置在磁力架上，待液体清澈后吸弃上清。

3.8 重复步骤 3.6-3.7，Wash Buffer 3 共清洗 3 次。

【注】磁力架尽可能靠近 PCR 仪，从 PCR 仪上取下 8 连管放在磁力架上，时间尽可能短，避免温度的大幅下降。

3.9 在 Wash Buffer 3 孵育期间，在冰上采用 1.5 mL LoBind 管配置 Post-PCR 反应体系，参考表 4。按照反应数目分装到新的 8 连管或 96 孔板，每孔 30 μL。做好样本标记，放置于冰上备用。同时取出 Hieff NGS® DNA Selection Beads 纯化磁珠放置室温平衡至少 30 min。

表 4 Post-PCR 反应体系

名称	1 次反应体积 (μL)	8 次反应体积 (μL)	16 次反应体积 (μL)
Post PCR Mix	25	240	480
Post PCR Primer for Illumina	5	48	96
<b>Total</b>	30	288	546

【注】对于多个 PCR 体系建议按照每个组分体积乘以实际反应数再乘以 1.2 倍配制混合液

3.10 三次清洗完成后，快速离心 10 s，再次放置于磁力架上用 10 μL 移液器尽可能吸走全部残余液体，最后加入 20 μL Nuclease-free Water 重悬磁珠，移液器轻轻吹打 8 次，将 8 连排移液器量程调至 40 μL，吸取全部磁珠混悬液加入 3.9 步骤标记好的 8 连管或 96 孔板中，再次轻轻吹打混匀 8 次，确保磁珠和 PCR 反应体系混合均匀。

【注】包含磁珠的 PCR 反应液不要离心，尽快放置于 PCR 仪上开始运行程序。

#### 4. Post-PCR 反应

4.1 将步骤 3.10 的混合体系放置于 PCR 仪上，按照表 5 程序进行 PCR 扩增：

表 5 Post-PCR 反应程序

温度	时间	循环数
98° C	45 s	1
98° C	15 s	循环数参照表 6
60° C	30 sec	
72° C	30 sec	
72° C	5 min	1
4° C	Hold	-

4.2 根据所使用的 Probes 类型选择不同的 PCR 循环数，表 6 为建议起始循环数：

表 6 Post-PCR 循环数推荐

Probes	单杂	2-4 个样品多杂	5-6 个样品多杂
<0.5 Mb	13-14	12-13	11-12
0.5 Mb-3 Mb	12-13	11-12	10-11
3 Mb-5 Mb	11-12	10-11	9-10
>5 Mb	10-11	9-10	8-9

4.3 PCR 完成后，将 8 连管或 96 孔板取下，快速离心 5 s 后放置于磁力架上，静置 1 min 后吸取全部上清液转移至新的 PCR 管中，然后加入 90 μL (1.8×) Hieff NGS® DNA Selection Beads 纯化磁珠，移液器吹打 8-10 次充分混匀。

【注】上清液中包含捕获后文库，请勿遗弃。确保 Hieff NGS® DNA Selection Beads 纯化磁珠已在室温平衡 30 min 以上，且使用前需充分旋混匀。

4.4 室温放置 5 min。在此期间准备 80% 的乙醇，用 Nuclease-free Water 进行配制，每个样本预计用量 400 μL。

**【注】**此时 PCR 管不要放在磁力架上。

4.5 放置于磁力架上静置 3- 5 min 澄清后吸弃上清液。

4.6 管子保持在磁力架上不要取下，加入 150  $\mu$ L 80%的乙醇，静置至磁珠完全吸附到一侧后，将管子从磁力架上取下方向调转 180 度，待磁珠完全吸附到另一侧后，再次调转。共调转 4 次后，吸弃上清。

4.7 重复步骤 4.6 操作。

4.8 快速离心后用 10  $\mu$ L 移液器弃去残余乙醇，室温放置 1- 3 min，直至磁珠表面无明显液体残留，呈无光泽或哑光状态。

**【注】**磁珠不要干燥过度以防文库产量降低。

4.9 从磁力架上取下管子，加入 20  $\mu$ L 的 Low TE 洗脱，移液器吹打 8- 10 次后室温静置 2 min。

4.10 放置于磁力架上静置澄清后吸取上清液，转移至新的 PCR 管中，放置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱保存，待文库质检和上机。

## 5. 文库质检和上机准备

5.1 使用 Agilent Bioanalyzer 2100 仪器对样本进行质检，2100 所需试剂为 High Sensitivity DNA Assay。

5.2 杂交捕获文库的峰值约为 300~ 500bp，一般文库浓度约在 0.5-10 ng/ $\mu$ L。文库适用于 Illumina (HiSeq 3000/ 4000, NextSeq platform, X-Ten 及 NovaSeq 等平台)。对于存在降解的 FFPE 样本，建议额外提高测试数据量。

**【注】**如果文库有小片段残余，总量足够情况下，可补水至 50  $\mu$ L，0.8X (40  $\mu$ L) 磁珠再纯化一次。



#### 附件 1：磁珠浓缩富集的替代方案

1. 将 Pooling 好的全部文库在 8 连管中用 Nuclease-free Water 补足到 50  $\mu\text{L}$ 。加入 90  $\mu\text{L}$  Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads 纯化磁珠，移液器吹打 10 次充分混匀。
2. 室温放置 5 min。在此期间准备 80%的乙醇，用 Nuclease-free Water 进行配制，每个样本预计用量 400  $\mu\text{L}$ 。
3. 放置于磁力架上静置 3-5 min 澄清后吸弃上清液。
4. 管子保持在磁力架上，加入 150  $\mu\text{L}$  80%的乙醇，静置至磁珠完全吸附到一侧后，将管子从磁力架上取下方向调转 180 度，待磁珠完全吸附到另一侧后，再次调转。共调转 4 次后，吸弃上清。
5. 重复操作步骤 4。
6. 快速离心后用 10  $\mu\text{L}$  移液器弃去残余乙醇，室温放置 1-3 min，直至磁珠表面无明显液体残留，呈无光泽或哑光状态。
7. 从磁力架上取下管子，加入 5  $\mu\text{L}$  的 Nuclease-free Water 和 7.5  $\mu\text{L}$  的 Universal Blocking Oligo (with cot-1)，移液器吹打 10 次混匀后室温静置 2 min。
8. 放置于磁力架上静置澄清后吸取上清液，转移至新的 8 连管中。
9. 接上述杂交过程的 1.4 步骤继续后续过程，注意探针杂交体系配置过程中不再添加 Universal Blocking Oligo。









帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐