

伯科生物捕获试剂盒实验手册 V6.2

（适用于 Illumina/MGI 测序平台，非甲基化 Panel 捕获。）

伯科生物科技有限公司

目录

1. 适配测序平台与试剂盒组成.....	1
2. 实验步骤概览.....	2
3. 实验准备.....	3
4. 用户自备试剂与耗材、设备.....	4
5. 实验步骤.....	5
附录一：捕获试剂盒不同模块信息.....	14
附录二：PCR 引物信息.....	15
附录三：Universal Blockers 适配文库接头序列信息.....	16

1. 适配测序平台与试剂盒组成

适配平台	试剂盒组成		
ILLUMINA Truseq	探针Pool (Panel)	Capture Kit Box 1 ILLUMINA-TS	Capture Kit Box 2 (Capture & Purification Beads)
ILLUMINA Nextera	探针Pool (Panel)	Capture Kit Box 1 ILLUMINA-NT	Capture Kit Box 2 (Capture & Purification Beads)
MGI 单端接头	探针Pool (Panel)	Capture Kit Box 1 MGI-SI	Capture Kit Box 2 (Capture & Purification Beads)
MGI 双端接头	探针Pool (Panel)	Capture Kit Box 1 MGI-Du	Capture Kit Box 2 (Capture & Purification Beads)

伯科为 Illumina 和 MGI 二代测序平台提供完整的捕获试剂，包括探针 Pool 以及捕获试剂盒(Capture Kit)，Capture Kit 由 Capture Kit Box 1(非磁珠类)和 Capture Kit Box 2(磁珠类, 通用型)两个模块组成, 用户可以根据使用的测序平台和文库类型选择相应的配套产品。

Capture Kit Box 1 分为 4 种产品，按照适配不同测序平台及文库接头适用于 Illumina Truseq 接头 (Illumina-TS)和 Nextera 接头 (Illumina-NT)，MGI 单端接头(MGI-SI)和双端接头(MGI-Du)。

Capture Kit Box 2 是通用型试剂，包括链霉亲和素磁珠和文库纯化磁珠。

2. 实验步骤概览

实验步骤		预期时间
A	探针准备	45 min
B*	文库预封闭	
C	探针与文库杂交	4 - 16 h
D、E	清洗液准备、磁珠准备	1.75 h
F	磁珠捕获	
G	捕获后清洗	
H*	PCR 扩增	
I*	PCR 产物纯化	2.5 h
J*	文库质控	
待测序文库(终文库)	总计时长	9 - 21 h

备注：*实验步骤结束后如需暂停，可将产物临时储存，实验暂停时间建议不超过 24h。

3. 实验准备

试剂盒提供试剂（产品信息见附录一）

名称	保存条件	用途说明
探针 Pool	-20°C	捕获目标区域文库
Probes Dissolve Buffer	15-25°C	探针溶解缓冲液
Cot-1 DNA	-20°C	封闭基因组重复序列
Universal Blockers*	-20°C	封闭文库接头
2X Hybridization Buffer	-20°C	
Hybridization Enhancer	-20°C	
2X Beads Wash Buffer	-20°C	
10X Wash Buffer S	-20°C	杂交与清洗缓冲液
10X Wash Buffer I	-20°C	
10X Wash Buffer II	-20°C	
10X Wash Buffer III	-20°C	
2x PCR ReadyMix	-20°C	
10x PCR PrimerMix**	-20°C	PCR 富集
Elution Buffer	15-25°C	
Streptavidin Beads	2-8°C	富集与目标区域文库结合后的探针 Pool
Purification Beads	2-8°C	纯化 PCR 富集后的终文库

*Universal Blockers	用途说明
Universal Blockers-ILMN-TS(Du)	封闭 Illumina Truseq 文库接头
Universal Blockers-ILMN-NT	封闭 Illumina Nextera 文库接头
Universal Blockers-MGI(SI)	封闭 MGI 单端文库接头
Universal Blockers-MGI(Du)	封闭 MGI 双端文库接头

Universal Blocker 适配文库接头序列信息见附录三

**10x PCR PrimerMix	用途说明
10x PCR PrimerMix(Illumina)	扩增 Illumina 文库
10x PCR PrimerMix(MGI-SI)	扩增 MGI 单端文库
10x PCR PrimerMix(MGI-Du)	扩增 MGI 双端文库

PCR 引物序列信息见附录二

4. 用户自备试剂与耗材、设备

试剂耗材	用途说明
无酶无菌水 (Nuclease-free Water)	杂交及清洗缓冲液工作液配制
无水乙醇	文库纯化
Qubit 检测试剂	文库浓度检测
Agilent 2100 检测试剂	文库片段分布检测
低吸附离心管 (1.5 mL)	文库杂交
平盖低吸附离心管 (0.2 mL)	杂交、捕获及 PCR

设备	用途说明
真空浓缩仪	浓缩文库、Cot-1 DNA 和 Blocker
PCR 仪	杂交及 PCR 富集
磁力架	磁珠清洗
掌上离心机	离心离心管
涡旋混匀仪	常温混匀及磁珠清洗
振荡混匀仪(可加热型)	1x Wash Buffer S 清洗磁珠时使用
金属浴	1x Wash Buffer S/I 加热孵育
Qubit 荧光计	文库浓度检测
Agilent 2100 或其他类似设备	文库片段分布检测

5. 实验步骤

-- 探针准备 (A 步骤) 与文库预封闭 (B 步骤) 后, 分为低通量操作流程与高通量操作流程 --

A. 探针准备

伯科探针 Pool 以干粉形式提供, 使用前先高速离心 1 min (12000 g), 使探针干粉保持在探针管底部, 随后向探针管加入 Probes Dissolve Buffer, 涡旋混匀, 在室温条件下孵育 10 min (期间混匀一次/5 min), 孵育完成后, 再次涡旋混匀探针管, 然后短暂离心, 完成探针溶解, -20 °C 保存待用(工作液: 4 μL / rxn)。

探针溶解试剂	探针工作液溶解(4 μL/rxn)	
	反应次数	溶解体积
1. Probes Dissolve Buffer (Cat# TC0014)	6 rxn	24 μL
2. Low TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)	96 rxn	384 μL

探针长期保存建议溶解为母液 (4x 或 10x) 存储, 探针溶解后可在-20°C条件下保存 18 个月以上, 上表中 2 种溶解试剂均可用于探针溶解; 探针混合使用 (Spike-in) 请参考《探针使用说明》。

B. 文库预封闭

B-1. 将下表试剂加入到 1.5 mL 低吸附离心管中, 使用真空浓缩仪 (温度不高于 70°C) 将离心管中溶液蒸干备用。

组分	数量
杂交文库总量	500-5000 ng*
Cot-1 DNA	5 μL
Universal Blockers**	2 μL

备注: (1) 可使用多文库杂交 Pooling, 单个文库用量推荐 500 -1000 ng (≥ 25% Pre-Lib), 且不低于 125 ng。
(2) 离心管蒸干后如需要暂时停止实验, 可在-20°C、4°C或室温过夜。

多文库杂交 Pooling 示例

杂交样本数量	单个文库质量	杂交文库总量*	
		illumina-TS/NT, MGI-Du, 500-5000 ng	MGI-SI, 500-4000 ng
10-Plex	500 ng	<u>5000</u>	
10-Plex	125 ng	1250	
4-Plex	1000 ng	4000	
4-Plex	500 ng	2000	
4-Plex	125 ng	<u>500</u>	
3-Plex	1000 ng	3000	
3-Plex	500 ng	1500	
3-Plex	167 ng	<u>500</u>	
2-Plex	1000 ng	2000	
2-Plex	250 ng	<u>500</u>	

Universal Blockers 适配文库接头信息

** Universal Blockers	货号	适用范围(接头序列见第 IV 页)
Universal Blockers-ILMN-TS(Du)	TC0010D9	Illumina Truseq 接头
Universal Blockers-ILMN-NT	TC00119	Illumina Nextera 接头
Universal Blockers-MGI(SI)	TC0012S9	MGI 单端接头
Universal Blockers-MGI(Du)	TC0012D9	MGI 双端接头

--- 低通量操作流程 ---

C-a 探针与文库杂交 -- 独立变性 (文库变性后, 独立加入探针)

C-a1. 将杂交试剂从冰箱中取出恢复到室温 (时间约 15 min)。

C-a2. 将下表试剂加入到步骤 B-1 中的离心管中, 室温孵育 10 min。同时设置两个 PCR 程序待用(95°C(热盖温度 105°C)和 65°C (热盖温度 75°C))。

组分	体积
2X Hybridization Buffer	8.5 μ L
Hybridization Enhancer	2.7 μ L
Nuclease-free Water	1.8 μ L
总体积	13 μL

C-a3. 使用移液器吹吸或涡旋混匀, 将液体转移到 0.2 mL 低吸附离心管中。

C-a4. 使用 PCR 仪 95°C 孵育 10 min, 使文库变性。

C-a5. 结束后, 将离心管转移至 65°C PCR 仪, 立即加入 4 μ L 探针工作液。

C-a6. 涡旋混匀, 短时离心。65°C 孵育 4~16 h (热盖 75°C)。

D-a. 清洗液准备

将清洗试剂从冰箱中取出恢复到室温 (时间约 30 min, 可加热融化 ($\leq 65^\circ\text{C}$)), 按照下表对试剂进行准备。

清洗试剂	体积/每个杂交反应	温度
1X Beads Wash Buffer	250 μ L	室温
1X Wash Buffer I	100 μ L	65°C
	200 μ L	室温
1X Wash Buffer II	200 μ L	室温
1X Wash Buffer III	200 μ L	室温
1X Wash Buffer S	400 μ L	65°C

备注:

- (1) 1X Wash Buffer I 和 1X Wash Buffer S 在 65°C 条件下预热 0.5 h 以上;
- (2) 使用 1.5mL 离心管在金属浴上进行热清洗, 预热的 1X Wash Buffer I 可按不同捕获反应分装至标记好的 1.5mL 离心管中进行 65°C 预热;
- (3) 对于清洗试剂的配制建议用 Nuclease-free water;
- (4) 10X Wash Buffer I 在室温条件下会出现白色颗粒物, 加热至全部溶解。!

E-a. Streptavidin Beads 准备

-- 不使用杂交缓冲液重悬 Streptavidin Beads

注意:

1. Streptavidin Beads 需要现用现备, 不可使磁珠干燥。

E-a1. 将 Streptavidin Beads 从冰箱中(4°C)取出恢复到室温 (约 30 min)。!

E-a2. 涡旋混匀 15 sec, 使磁珠充分重悬。

E-a3. 取 50 μ L Streptavidin Beads 加入到新的 1.5 mL 低吸附离心管中。

E-a4. 将离心管放到磁力架上, 直到溶液澄清。

E-a5. 吸弃上清, 切勿扰动磁珠。

E-a6. 按以下步骤对 Streptavidin Beads 进行清洗:

① 将离心管从磁力架上取下, 加入 100 μ L 1X Beads Wash Buffer, 涡旋振荡 10 sec。

② 将离心管瞬时离心, 放到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清, 切勿扰动磁珠。

E-a7. 重复步骤 E-a6。

E-a8. 将 E-a7 离心管从磁力架上取下, 加入 50 μ L 1X Beads Wash Buffer。将离心管中的 50 μ L 磁珠重悬液转移到新的 0.2 mL 低吸附离心管中。将 0.2 mL 低吸附离心管放到磁力架上, 直到溶液澄清。吸弃上清, 切勿扰动磁珠, 关闭管盖 后立即进入实验步骤 “F-a”。

F-a Streptavidin 磁珠捕获(磁珠通过链霉亲和素与生物素探针结合)

-- 将杂交反应液(步骤 C)转移至弃上清后的 Streptavidin Beads 中 (仔细确认已吸弃上清) !

F-a1. 将吸弃上清后的 Streptavidin Beads (步骤 E-a8) 放入 65°C PCR 仪上 (热盖温度 75°C), 打开 Streptavidin Beads 管盖, 将杂交反应液 (步骤 C-a6) 转移至 Streptavidin Beads 中, 在 PCR 仪上使用移液器轻柔吹吸 10 次混匀, 使磁珠充分悬浮。以上操作均在 PCR 仪上完成!

F-a2. 在 65°C (热盖温度 75°C) 条件下孵育 45 min, 每 12 min 涡旋混匀 3 sec, 确保磁珠处于悬浮状态。孵育结束后进入实验步骤 “G-a. 低通量捕获后清洗”。

注意: 45min 孵育期间, 涡旋混匀时应保证磁珠不与管盖接触。

G-a. 低通量捕获后清洗

-- 1.5 mL 离心管+金属浴_实验操作

G-a1. 65°C 清洗

G-a1-1. 将 100 μ L 预热的 1X Wash Buffer I 加入到含有 Streptavidin Beads 和杂交反应液的 0.2 mL 低吸附离心管中 (步骤 F-a2)。

G-a1-2. 吹吸混匀使 Streptavidin Beads 重悬，随后立即将所有溶液转移到新的 1.5 mL 低吸附离心管中（如果已经提前分装预热的 1X Wash Buffer I，则转移回原管即可，D-a 步骤备注(2)）。

G-a1-3. 将 1.5 mL 离心管放置到磁力架上，直到溶液澄清(约 3 sec)，吸弃上清。

G-a1-4. 继续按以下步骤进行清洗：

1. 加入 200 μ L 预热的 1X Wash Buffer S，涡旋混匀后，在 65°C 条件下振荡孵育 5 min。
2. 瞬时离心，将离心管放置到磁力架上，直到溶液澄清，吸弃上清。

G-a1-5. 重复步骤 **G-a1-4**。

备注： (1) 如果不使用加热型振荡混匀仪，可在 65°C 金属浴上孵育，孵育 5 min 期间 2.5 min 时涡旋振荡一次。

(2) 热洗步骤对捕获效率影响较大，应迅速操作，尽量减少室温时间。

G-a2. 室温清洗 (<100 Kb Panel 需在加入 Wash Buffer II 后，转移至新的 1.5mL 离心管)

G-a2-1. 加入 180 μ L 1X Wash Buffer I，涡旋混匀 2 min。将离心管瞬时离心，放置到磁力架上，直到溶液澄清，吸弃上清。

G-a2-2A. 如果捕获区域 (Capture Region) <100 Kb Panel，加入 180 μ L 1X Wash Buffer II 后，轻柔吹吸混匀后转移至新的 1.5mL 离心管中，涡旋混匀 1 min，再次瞬时离心，放置到磁力架上，直到溶液澄清，吸弃上清，进入步骤 G-a2-3。

G-a2-2B. 如果捕获区域 (Capture Region) \geq 100 Kb Panel，加入 180 μ L 1X Wash Buffer II 后，涡旋混匀 1 min，再次瞬时离心，放置到磁力架上，直到溶液澄清，吸弃上清，进入步骤 G-a2-3。

G-a2-3. 加入 180 μ L 1X Wash Buffer III，涡旋混匀 30 sec。将离心管瞬时离心，放置到磁力架上，直到溶液澄清，吸弃上清。

G-a3. 磁珠重悬

G-a3-1. 立即加入 20 μ L 无酶无菌水。

G-a3-2. 使用移液器吹吸 10 次，重悬磁珠，进入实验步骤“H. PCR 扩增” (第 12 页)。

--- 高通量操作流程 ---

C-b 探针与文库杂交 -- 共变性（探针与文库共同变性，不再单独加入探针）

C-b1. 将杂交试剂从冰箱中取出恢复到室温（时间约 15 min）。

C-b2. 将下表试剂加入到步骤 B-1 中的离心管中，室温孵育 10 min。

组分	体积
2X Hybridization Buffer	8.5 μ L
Hybridization Enhancer	2.7 μ L
Panel (探针工作液)	4.0 μ L
Nuclease-free Water	1.8 μ L
总体积	17 μL

C-b3. 使用移液器吹吸或涡旋混匀，将液体转移到 0.2mL 低吸附离心管（或 0.2mL 八联排离心管）。

C-b4. 将 0.2 mL 低吸附离心管放入 PCR 仪，然后运行共变性程序。

C-b5. 共变性程序：95°C 30 sec，65°C Hold（**热盖 100°C**），65°C 孵育 4~16 h。

C-b6. 孵育结束后，准备另一台 PCR 仪，运行程序：65°C Hold（**热盖 75°C**），待用（F-b1 步骤使用）。

D-b. 清洗液准备

将清洗试剂从冰箱中取出恢复到室温（时间约 30 min，可加热融化（ $\leq 65^\circ\text{C}$ ）），按照下表对试剂进行准备。

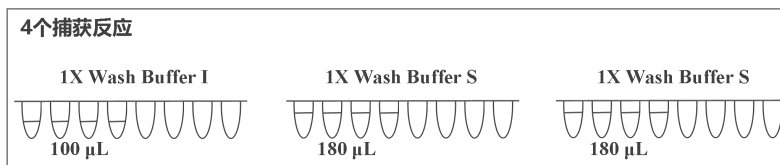
清洗试剂	体积/每个杂交反应	温度
1X Beads Wash Buffer	250 μ L	室温
1X Wash Buffer I	100 μ L	65°C
	200 μ L	室温
1X Wash Buffer II	200 μ L	室温
1X Wash Buffer III	200 μ L	室温
1X Wash Buffer S	400 μ L	65°C

备注：

(1) 1X Wash Buffer I 和 1X Wash Buffer S 在 65°C 条件下预热 0.5 h 以上；

(2) 如果使用 0.2mL 离心管在 PCR 仪上进行热清洗，预热的 1X Wash Buffer I 和 1X Wash Buffer S 可分装到 0.2mL 离心管或 0.2mL 八联排离心管中，在 PCR 仪上进行 65°C 预热（实验步骤 G-b 中使用）；

1X Wash Buffer I: 100 μ L x1, 1X Wash Buffer S: 180 μ L x2；下图示出了使用 0.2mL 八联排离心管进行预热。



(3) 对于清洗试剂的配制建议用 Nuclease-free water;

(4) 10X Wash Buffer I 在室温条件下会出现白色颗粒物，加热至全部溶解！

E-b. Streptavidin Beads 准备

-- 使用 **1x 杂交缓冲液** 重悬 Streptavidin Beads

-- **1x 杂交缓冲液**: 探针替换为 Water

注意:

1. Streptavidin Beads 需要现用现备, 不可使磁珠干燥。

E-b1. 将 Streptavidin Beads 从冰箱中(4°C)取出恢复到室温 (约 30 min)。!

E-b2. 涡旋混匀 15 sec, 使磁珠充分重悬。

E-b3. 取 50 μ L Streptavidin Beads 加入到新的 1.5 mL 低吸附离心管中。

E-b4. 将离心管放到磁力架上, 直到溶液澄清。

E-b5. 吸弃上清, 切勿扰动磁珠。

E-b6. 按以下步骤对 Streptavidin Beads 进行清洗:

① 将离心管从磁力架上取下, 加入 100 μ L 1X Beads Wash Buffer, 涡旋振荡 10 sec。

② 将离心管瞬时离心, 放到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清, 切勿扰动磁珠。

E-b7. 重复步骤 E-b6。

E-b8. 将 E-a7 离心管从磁力架上取下, 加入下表试剂 (可提前配制预混液), 吹吸混匀后将 17 μ L **1x 杂交缓冲液** 重悬的 Streptavidin Beads 磁珠, 然后转移到新的 0.2 mL 离心管中 (或 0.2mL 八联排离心管), 盖上管盖, 随后立即进入实验步骤 “F-b”。

1x 杂交缓冲液配制	体积
2X Hybridization Buffer	8.5 μ L
Hybridization Enhancer	2.7 μ L
Nuclease-free Water	5.8 μ L
总体积	17 μ L

备注: 伯科提供 “STBuffer” 产品 (货号: TC0023B) 用于配制 1x 杂交缓冲液 (见 14 页)。

F-b Streptavidin 磁珠捕获(磁珠通过链霉亲和素与生物素探针结合)

-- 将 **1x 杂交缓冲液** 重悬的 Streptavidin Beads 加入杂交反应液 (步骤 C-b5) 中

F-b1. 将杂交反应液 (步骤 C-b5) 和 **1x 杂交缓冲液** 重悬的 Streptavidin Beads (步骤 E-8b) 转移至 65°C PCR 仪上 (热盖温度 75°C), 10 sec 后打开 Streptavidin Beads 管盖, 将 **1x 杂交缓冲液** 重悬的 Streptavidin Beads 转移至杂交反应液中, 在 PCR 仪上使用移液器轻柔吹吸 10 次混匀, 使磁珠充分悬浮。

以上操作均在 PCR 仪上完成!

F-b2. 在 65°C (热盖温度 75°C) 条件下孵育 45 min, 每 12 min 涡旋混匀 3 sec, 确保磁珠处于悬浮状态。孵育结束后进入实验步骤 “G-b. 高通量捕获后清洗”。

注意: 45min 孵育期间, 涡旋混匀时应保证磁珠不与管盖接触。

G-b. 高通量捕获后清洗

-- 0.2 mL 离心管+PCR 仪_实验操作

G-b1. 65°C 清洗

G-b1-1. 将移液器调整至 150 μ L, 吸取 PCR 仪上预热的 100 μ L 1X Wash Buffer I 加入到含有 Streptavidin Beads 和杂交反应液的 0.2 mL 低吸附离心管中 (步骤 F-b2)。

G-b1-2. 吹吸混匀 10 次以上, 使溶液中 Streptavidin Beads 充分清洗。

G-b1-3. 将 0.2 mL 离心管放置到磁力架上, 直到溶液澄清(约 5 sec), 吸弃上清后, 将 0.2mL 离心管放回 PCR 仪, 立即进入后续操作。

G-b1-4. 继续按以下步骤进行清洗:

1. 立即加入 **150 μ L** 预热的 1X Wash Buffer S, 吹吸混匀 10 次以上, 使缓冲液中 Streptavidin Beads 充分清洗, 盖上 PCR 热盖, 在 65°C 条件下静止孵育 5 min。

2. 瞬时离心, 将离心管放置到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清。

G-b1-5. 重复步骤 G-b1-4。

备注: ! 热洗步骤对捕获效率影响较大, 应迅速操作, 尽量减少室温时间。

G-b2. 室温清洗 (<100 Kb Panel 推荐在加入 Wash Buffer II 后, 转移至新的 0.2 mL 离心管)

G-b2-1. 加入 **150 μ L** 1X Wash Buffer I, 吹吸混匀 10 次以上使磁珠充分清洗, 静止 2 min。将离心管瞬时离心, 放置到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清。

G-b2-2A. 如果捕获区域 (Capture Region) < 100 Kb Panel, 加入 150 μ L 1X Wash Buffer II 后, 轻柔吹吸混匀后转移至新的 0.2mL 离心管中, 吹吸混匀 10 次以上使磁珠充分清洗, 静止 1 min。将离心管瞬时离心, 放置到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清, 进入步骤 G-b2-3。

G-b2-2B. 如果捕获区域 (Capture Region) \geq 100 Kb Panel, 加入 150 μ L 1X Wash Buffer II 后, 吹吸混匀 10 次以上使磁珠充分清洗, 静止 1 min。将离心管瞬时离心, 放置到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清, 进入步骤 G-b2-3。

G-b2-3. 加入 **150 μ L** 1X Wash Buffer III, 涡吹吸混匀 10 次以上使磁珠充分清洗, 静止 30 sec。将离心管瞬时离心, 放置到磁力架上, 直到溶液澄清, 吸弃上清。

G-b3. 磁珠重悬

G-b3-1. 立即加入 20 μ L 无酶无菌水。

G-b3-2. 使用移液器吹吸 10 次, 重悬磁珠, 进入实验步骤 “H. PCR 扩增”。

H. PCR 扩增

H-1. 按照下表配置 PCR 反应体系

组分	体积
2x PCR ReadyMix	25 μ L
10x PCR PrimerMix	5 μ L
Beads with captured DNA (步骤 G-3-2)	20 μ L
总体积	50 μ L

H-2. 吹吸或低速涡旋混匀使磁珠保持悬浮状态，立即进入步骤 H-3。

H-3. 使用 PCR 仪按以下程序运行，热盖温度 105°C。

温度 (°C)	时间	循环数
98	45 sec	1
98	15 sec	12*
60	30 sec	
72	30 sec	
72	1 min	1
4	Hold	1

*0.1 - 42 Mb Panel 循环数根据下表调整（杂交时间为 16h）

杂交文库总量	捕获区域大小(探针覆盖区域, Capture Region)	循环数	终文库产量
500 ng (Cell Line gDNA、 300 bp Insert)	0.1-0.65 Mb	15	100 - 800 ng
	1.2-2.7 Mb	12	200 - 400 ng
	13 Mb	10	200 ng
	42 Mb	8	100 ng

*<100 Kb Panel 循环数根据下表调整（杂交时间为 16h）

杂交文库总量	捕获区域大小 (探针覆盖区域, Capture Region)	循环数	终文库产量
1500 ng (cfDNA 预文库)	12 Kb	17	~ 200 ng
	43 Kb	16	~ 350 ng
	94 Kb	16	300 - 400 ng

备注:

1. TargetCap® Inherited Disease Research Panel \approx 13 Mb; TargetCap® Core Exome Panel v3.0 \approx 42 Mb
2. MGI 测序平台上机所需文库质量与 Illumina 平台不同，可根据实际需要调整循环数。
3. 杂交时间、Panel 区域组成、Blocker 性能、预文库 Insert 等因素均会影响终文库产量，请按照实际情况调整。
4. 如果终文库浓度过低，可增加预文库用量或使用多文库杂交，推荐 4 - 8-Plex，杂交文库总量不超过 5 μ g。

I. PCR 产物纯化

I-1. 向每个 PCR 管中加入 60 μL Purification Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

备注：也可使用 Ampure XP 磁珠进行纯化，使用体积相同。

I-2. 短时离心，上磁力架，吸附至溶液澄清(~5 min)，弃上清。

I-3. 加入 200 μL 80%乙醇，静止 30sec 或使用移液器吹吸 10 次，吸弃上清。

I-4. 重复 I-3 一次。

I-5. 短时离心，上磁力架，吸弃剩余液体，干燥磁珠至亚光色，加入 22 μL Elution Buffer，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

I-6. 短时离心，上磁力架，至溶液澄清，转移 20 μL 包含捕获文库的洗脱液到新的 1.5 mL 低吸附离心管中。

J. 文库质控

J-1. 使用 Qubit 荧光计测量文库浓度。

J-2. 使用 Agilent 2100 测量文库片段长度，常规二代重测序外显子文库片段长度不大于 500 bp，无明显双峰，无明显大片段污染。

附录一：捕获试剂盒不同模块信息

Capture Kit	Box 1				Box 2
	Reagents	TC00311	TC00312	TC00313	TC00314
Probes Dissolve Buffer	√	√	√	√	
Cot-1 DNA	√	√	√	√	
Universal Blockers	<i>ILMN-TS</i>	<i>ILMN-NT</i>	<i>MGI(SI)</i>	<i>MGI(Du)</i>	
2x Hybridization Buffer	√	√	√	√	
Hybridization Enhancer	√	√	√	√	
2x Beads Wash Buffer	√	√	√	√	
10x Wash Buffer S	√	√	√	√	
10x Wash Buffer I	√	√	√	√	
10x Wash Buffer II	√	√	√	√	
10x Wash Buffer III	√	√	√	√	
2x PCR ReadyMix	√	√	√	√	
<i>10x PCR PrimerMix</i>	<i>ILLUMINA</i>	<i>ILLUMINA</i>	<i>MGI-SI</i>	<i>MGI-Du</i>	
Elution Buffer	√	√	√	√	
Streptavidin Beads					√
Purification Beads					√
STBuffer (Cat# TC0023B)					
Reagents	2x Hybridization Buffer				
	Hybridization Enhancer				

附录二：PCR 引物信息

试剂名称		引物组分 (10 μ M Each)	
10x PCR PrimerMix (Illumina)	P5 Primer (5'-3')		AATGATACGGCGACCACCGA
	P7 Primer (5'-3')		CAAGCAGAAGACGGCATAACGA
10x PCR PrimerMix (MGI-SI)	MGIAd_PCR_1 (5'-3')		/Phos/GAACGACATGGCTACGA
	MGIAd_PCR_2 (5'-3')		TGTGAGCCAAGGAGTTG
10x PCR PrimerMix (MGI-Du)	MGI-Du-1 (5'-3')		/Phos/CTCTCAGTACGTCAGCAGTT
	MGI-Du-2 (5'-3')		GCATGGCGACCTTATCAG

注：10x PCR PrimerMix (MGI-SI)或 10x PCR PrimerMix (MGI-Du)引物具有磷酸化修饰，使用上述引物试剂进行 PCR 富集后，所获得的终文库可直接环化后上机测序，无需再使用激酶修饰或磷酸化引物进行扩增。

附录三： Universal Blockers 适配文库接头序列信息

Illumina Truseq 文库序列信息(Illumina-TS)

```
5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACxxxxxxxxxACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT [Insert]AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACxxxxxxxxxATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'
3' TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTGxxxxxxxxxTGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA [Insert]TCTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTGxxxxxxxxxTAGAGCATAACGGCAGAAGACGAAC 5'
```

Illumina Nextera 文库序列信息(Illumina-NT)

```
5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACxxxxxxxxxTCGTCCGAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG [Insert]CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCACGAGACxxxxxxxxxATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'
3' TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTGxxxxxxxxxAGCAGCCGTCGCAGTCTACACATATTCTCTGTC [Insert]GACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGTCTGxxxxxxxxxTAGAGCATAACGGCAGAAGACGAAC 5'
```

MGI 单端文库序列信息 (MGI-S1)

```
5' Phos-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT [Insert]AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAAxxxxxxxxxCAACTCCTTGGCTCACA 3'
3' CTTGCTGTACCGATGCTAGGCTGAA [Insert]TTCAGCCTCCGGTTCGCCAGAATCCTTCTGTTxxxxxxxxxGTTGAGGAACCGAGTGT 3'
```

MGI 双端文库序列信息 (MGI-Du)

```
5' Phos-CTCTCAGTACGTCAGCAGTTxxxxxxxxxCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTT [Insert]AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAAxxxxxxxxxCTGATAAGGTCGCCATGC 3'
GAGAGTCATGCAGTCGTCAAxxxxxxxxxGTTGAGGAACCGAGTGTCTTGTGTACCGATGCTAGGCTGAA [Insert]TTCAGCCTCCGGTTCGCCAGAATCCTTCTGTTxxxxxxxxxGACTATTCCAGCGGTACG 5'
```

无锡地址：无锡市锡东新城商务区丹山路 82 号创融大厦 D
座 5 层

电话：(0510)68108516 或 18612820048

网址：<http://www.bokebiotech.com>

邮箱：info@bokebiotech.com



伯科生物