



Magbead HMW DNA Kit

磁珠法高分子量DNA提取试剂盒

Cat.No. CW3701

产品简介

该试剂盒创新性的采用了超顺磁性的微米级磁珠纯化技术，应用于广泛样本的高分子量DNA (50-200kb) 的提取，包括动物组织、血液、细菌和细胞等（表1）。高性能的磁珠能够使整个提取时间短至一小时之内，同时确保分离的DNA具有较高的得率和纯度。高度选择性的微米级磁珠结合技术，能够很大程度上减少提取过程中的剪切力，从而得到高纯度的高分子量DNA。纯化的DNA完整度高，长度长，适合运用于NGS、三代测序高质量DNA文库构建等下游分子生物学实验。

表1 产品参数

Specification	
样本投入	200 μ L 全血；最多25 mg 组织；最多 2×10^9 细菌、 10^6 细胞
洗脱体积	100-200 μ L
提取时间	60 分钟
DNA长度	大于50kb

保存条件： 2-30°C保存，常温运输，运输时间建议不超过7天

产品内容

Component	CW3701S 10 preps	CW3701M 50 preps
Buffer ATL	3 mL	15 mL
Buffer AL	4 mL	18 mL
Buffer MB	8mL	40 mL
Buffer DW	8 mL	40 mL
Buffer EB	18 mL	70 mL
Buffer TB	3 mL	15 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0.3 mL	1.25 mL
RNase A (100 mg/mL)	0.06 mL	0.3 mL
Magbeads G	0.5 mL	2 x 1.25 mL

自备试剂和仪器

1. 摇床
2. 微型离心机 (带2 mL 转子)
3. 混匀装置
4. 磁力架
5. 2 mL 样本管
6. 枪头
7. 乙醇 (96-100%)

组织样本

1. 组织制备设备: 例如手术刀, 干冰等
2. 天平
3. 金属浴

细菌样本

1. 培养细菌的设备
2. 微型离心机 (带2 mL 转子)
3. 溶菌酶 (100 mg) (货号: CW0887S)
4. 溶菌酶缓冲液 (自备): 50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM Na₂-EDTA, pH 8.0, 121°C灭菌处理20分钟。金属浴

实验前准备和重要注意事项

1. 请尽量避免操作过程中剧烈震荡, 产生剪切力, 使DNA断裂。
2. 若样本为冷冻血液样本, 需要将血样本平衡至室温; 若为新鲜血液样本, 需颠倒混匀; 在实验开始前将恒温混匀仪预热至56°C。
3. Magbeads G每次使用时请充分振荡混合均匀。

注意: Magbeads G严禁冰冻和高速离心, 否则可能会对Magbeads G造成不可逆的损害。

用前请先检查Buffer ATL、Buffer AL是否出现结晶或沉淀, 如有结晶或沉淀, 可在37°C水浴几分钟, 溶液恢复澄清。若因温度原因, 仍有结晶和沉淀, 可继续37°C水浴, 直至溶液恢复澄清。

起始样本的定量

1. 哺乳动物血液: 样本初始量200-300 μL 。
2. 哺乳动物组织: 一个2 mm的立方体 (体积8 mm^3) 动物组织, 大概的重量为10-15 mg。
3. 培养的哺乳动物细胞: 细胞数量控制在 10^6 。
4. 细菌: 细菌数量控制在 10^9 。

操作步骤

哺乳动物血液

该方案能够从冷冻或者新鲜抗凝全血 (EDTA、柠檬酸钠) 提取高分子量DNA。冷冻血液样本, 需在37°C中快速解冻, 并适当震荡混匀, 使其充分混匀。确保开始操作前样本平衡至室温。纯化的DNA的产量和质量取决于血液的存储条件, 新鲜血液样本可能会产生更好的结果。

1. 在 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μL Proteinase K 和 200 μL 血液, 轻轻涡旋震荡混匀。
2. 瞬时离心, 加入 300 μL Buffer AL和5 μL RNase A, 轻轻涡旋混匀 10 s, 瞬时离心, 56°C, 900 rpm 孵育 15 min。
3. 孵育结束后, 瞬时离心, 加入 300 μL 异丙醇和 20 μL Magbeads G, 轻轻涡旋混匀 10 s, 室温900 rpm 振荡混匀 5 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。
4. 将离心管转移至磁力架吸附 1 min (直至溶液澄清), 小心吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
5. 向离心管加入650 μL Buffer MB, 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
6. 向离心管加入650 μL Buffer DW, 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
7. 向离心管加入650 μL 75%乙醇 (自备), 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
8. 重复步骤 7 一次。

9. 向离心管（此时离心管固定在磁力架上，沿磁珠对侧一面）缓慢加入650 μL Buffer EB，轻轻漂洗一次（切勿用移液器吸头吹打散磁珠），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 将除尽上清后的离心管，加入80-100 μL Buffer TB，轻轻涡旋混匀10 s，重悬磁珠，56 $^{\circ}\text{C}$ ，1200 rpm孵育10 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。转移至磁力架上吸附1 min，吸取上清至新的离心管中备用，纯化的DNA可以储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期备用。

新鲜和冷冻哺乳动物组织

该方案适用于冷冻和冻存组织样本的酶解。纯化的DNA的产量和质量取决于组织类型、来源和存储条件。

1. 称取25-30 mg（脾脏用量应少于10 mg）动物组织经液氮研磨成细粉或用解剖刀切成小碎块，转入预先装有220 μL Buffer ATL的2 mL离心管中，涡旋充分混合，瞬时离心。
2. 加入20 μL Proteinase K，涡旋振荡混匀，瞬时离心。
3. 56 $^{\circ}\text{C}$ ，900 rpm孵育30 min直至组织完全溶解，短暂离心以收集管盖内壁上的溶液。
4. 将上一步离心管5000 g离心3分钟，吸取200 μL 裂解产物到一个新的2 mL离心管中。
5. 加入5 μL RNase A，轻轻震荡混匀，室温放置10min。
6. 加入150 μL Buffer AL，并通过轻轻涡旋充分混合，瞬时离心。
7. 加入280 μL 异丙醇和40 μL Magbeads G，轻轻涡旋混匀10 s，瞬时离心，1200 rpm室温振荡混匀10 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。
8. 将离心管转移至磁力架吸附1min（直至溶液澄清），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
9. 向离心管加入650 μL Buffer MB，轻轻涡旋混匀10 s，重悬磁珠，1200 rpm室温振荡混匀3 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min（直至溶液澄清），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
10. 向离心管加入650 μL Buffer DW，轻轻涡旋混匀10 s，重悬磁珠，1200 rpm室温振荡混匀3 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min（直至溶液澄清），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
11. 向离心管加入650 μL 75%乙醇（自备），轻轻涡旋混匀10 s，重悬磁珠，1200 rpm室温振荡混匀3 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min（直至溶液澄清），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
12. 重复步骤 11 一次。
13. 向离心管（此时离心管固定在磁力架上，沿磁珠对侧一面）缓慢加入650 μL Buffer EB，轻轻漂洗一次（切勿用移液器吸头吹打散磁珠），吸弃溶液，期间避免接触磁珠。
14. 重复步骤 13 一次。
15. 将除尽上清后的离心管，加入80-100 μL Buffer TB，轻轻涡旋混匀10s，重悬磁珠，56 $^{\circ}\text{C}$ ，1200 rpm孵育10 min，结束后瞬时离心，保证管盖上无液体。转移至磁力架上吸附1 min，吸取上清至新的离心管中备用，纯化的DNA可以储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期备用。

革兰氏阳性菌

该方案能够从革兰氏阳性菌培养物中提取高分子量DNA。

1. 取新鲜培养细菌于1.5 mL离心管中(菌量控制在 1×10^9 , 菌量过多会影响裂解效果), 7000 rpm, 离心3 min, 去上清。
2. 在1.5 mL离心管中加入160 μ L 溶菌酶缓冲液和20 μ L溶菌酶(100 mg/ml), 用枪头吹打混匀沉淀。
3. 37°C, 900 rpm, 孵育30 min, 直至菌沉完全溶解。
注意: 若菌沉没有完全溶解, 可延长裂解时间, 直至菌沉完全溶解。
4. 加入150 μ L Buffer AL和20 μ L Proteinase K, 震荡混匀, 瞬时离心后56°C孵育30min。
5. 加入5 μ L RNase A, 轻轻震荡混匀, 室温放置10min。
6. 加入280 μ L Buffer MB和20 μ L Magbeads G, 轻轻涡旋混匀10 s, 1200 rpm室温振荡混匀10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。
7. 将离心管转移至磁力架吸附1 min(直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
8. 向离心管加入650 μ L Buffer MB, 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min(直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
9. 向离心管加入650 μ L Buffer DW, 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min(直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
10. 向离心管加入650 μ L 75%乙醇(自备), 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min(直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 向离心管(此时离心管固定在磁力架上, 沿磁珠对侧一面)缓慢加入650 μ L Buffer EB, 轻轻漂洗一次(切勿用移液器吸头吹打散磁珠), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
13. 重复步骤 12 一次。
14. 将除尽上清后的离心管, 加入80-100 μ L Buffer TB, 轻轻涡旋混匀10s, 重悬磁珠, 56°C, 1200 rpm孵育10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。转移至磁力架上吸附1 min, 吸取上清至新的离心管中备用, 纯化的DNA可以储存在-20°C长期备用。

革兰氏阴性菌

该方案能够从革兰氏阴性菌培养物中提取高分子量DNA。

1. 取新鲜培养细菌于1.5 mL离心管中(菌量控制在 1×10^9 , 菌量过多会影响裂解效果), 7000 rpm, 离心3 min, 去上清。
2. 在1.5 mL离心管中加入200 μ L Buffer ATL, 用枪头吹打混匀沉淀。
3. 加入20 μ L Proteinase K, 震荡混匀, 瞬时离心后56°C孵育30min, 直至菌沉完全溶解。
注意: 若菌沉没有完全溶解, 可延长裂解时间, 直至菌沉完全溶解。

4. 孵育结束后, 加入5 μL RNase A, 轻轻震荡混匀, 室温放置10 min。
5. 加入280 μL Buffer MB和20 μL Magbeads G, 涡旋混匀10s, 1200 rpm室温振荡混匀10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。
6. 将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
7. 向离心管加入650 μL Buffer MB, 涡旋混匀10s, 重悬磁珠, 120 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
8. 向离心管加入650 μL Buffer DW, 涡旋混匀1s, 重悬磁珠, 120 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
9. 向离心管加入650 μL 75%乙醇 (自备), 涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 向离心管 (此时离心管固定在磁力架上, 沿磁珠对侧一面) 缓慢加入650 μL Nuclease-Free Water, 轻轻漂洗一次 (切勿用移液器吸头吹打散磁珠), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
12. 重复步骤 11 一次。
13. 将除尽上清后的离心管, 加入80-100 μL Buffer TB, 轻轻涡旋混匀10s, 重悬磁珠, 56°C, 1200 rpm孵育10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。转移至磁力架上吸附1 min, 吸取上清至新的离心管中备用, 纯化的DNA可以储存在-20°C长期备用。

哺乳动物培养细胞

1. 取新鲜培养细胞于1.5 mL离心管中 (细胞数量控制在 1×10^6 , 细胞量过多会影响裂解效果), 7000 rpm, 离心3 min, 去上清。
2. 在1.5 mL离心管中加入200 μL Buffer ATL, 用枪头吹打混匀沉淀。
3. 加入20 μL Proteinase K, 震荡混匀, 瞬时离心后56°C孵育30 min, 直至细胞沉淀完全溶解。
注意: 若细胞没有完全溶解, 可延长裂解时间, 直至细胞完全溶解。
4. 孵育结束后, 加入5 μL RNase A, 轻轻震荡混匀, 室温放置10 min。
5. 加入280 μL Buffer MB和20 μL 20 μL Magbeads G, 涡旋混匀10 s, 1200 rpm室温振荡混匀10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。
6. 将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
7. 向离心管加入650 μL Buffer MB, 涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
8. 向离心管加入650 μL Buffer DW, 涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。

9. 向离心管加入650 μL 75%乙醇 (自备), 涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 1200 rpm室温振荡混匀3 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。将离心管转移至磁力架吸附1 min (直至溶液澄清), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 向离心管 (此时离心管固定在磁力架上, 沿磁珠对侧一面) 缓慢加入650 μL Buffer EB, 轻轻漂洗一次 (切勿用移液器吸头吹打散磁珠), 吸弃溶液, 期间避免接触磁珠。
12. 重复步骤 11 一次。
13. 将除尽上清后的离心管, 加入80-100 μL Buffer TB, 轻轻涡旋混匀10 s, 重悬磁珠, 56 $^{\circ}\text{C}$, 1200 rpm孵育10 min, 结束后瞬时离心, 保证管盖上无液体。转移至磁力架上吸附1 min, 吸取上清至新的离心管中备用, 纯化的DNA可以储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期备用。

常见问题分析

问题	对策	具体方法
DNA产量低	缓冲液储存	试剂在15 $^{\circ}\text{C}$ 下储存可能会导致沉淀的产生。
	缓冲液蒸发	溶液的过度蒸发会使Buffer中盐离子浓度增加。
	加入的磁珠量不够	每次使用时请充分振荡混合均匀。 使用磁珠时, 需充分涡旋混匀至少30秒以混匀磁珠, 每加6-10个样本再次涡旋10秒。
	裂解不充分	使用前, 请检查Buffer中不含沉淀物。如有沉淀物, 请37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育直至溶液变澄清。
	冻存血液样本解冻后混合不当	延长蛋白酶K的消化时间, 确保组织完全消化。
	组织样本消化不完全	适当增加上样体积, 但是不要超过推荐样本量。
	由于不溶物堵塞枪头	不溶性物质没有从消化中去除。 为了去除不溶性物质, 将样品在20,000 $\times\text{g}$ 下离心3分钟, 并将上清转移到新的样品管中。
	起始物料的储存	DNA产量取决于起始材料的类型、大小、年龄和储存条件等。不适当储存的材料产量会降低。
	样本投入量太多	减少样本的投入量。
DNA在下游应用中表现不佳	洗脱液中几乎没有DNA	参阅上文“DNA产量低”。
	磁珠残留	洗脱液中磁珠的残留不会影响到大多数下游应用。 如果必须将磁珠残留的风险降至最低, 首先将含有洗脱液的试管放置在磁吸器中, 然后将洗脱液转移到清洁管中。
	盐离子残留	确保Buffer EB和Buffer TB的添加顺序正确。 确保结合步骤和Buffer DW洗涤步骤后的上清完全清除。 如有必要, 使用较小的移液管除去任何剩余的可见液体。
	下游应用中使用了过量DNA	过量的DNA会抑制一些酶促反应。用分光光度法测定260 nm处的吸光度, 定量纯化的DNA。

问题	对策	具体方法
DNA在下游应用中表现不佳	组织中提取的DNA降解	可能用了太多的样品。过量的样本投入可能导致裂解不足，从而导致潜在DNA酶的失活不足。
纯化DNA的A260/A280比值较低	乙醇残留	在最后的洗涤步骤中尽可能多地吸出乙醇。按照方案中所述用Buffer EB仔细冲洗磁珠颗粒。
	盐离子残留	确保结合步骤和Buffer DW洗涤步骤后的上清完全清除。如有必要，使用较小的移液管除去任何剩余的可见液体。
	260 nm和280 nm处吸光度读数没有减去320 nm吸光度读数	为了纠正洗脱液中磁性颗粒的存在，应该取320 nm处的吸光度读数，并从260 nm和280 nm处获得的吸光度读数中减去。
	用水洗脱	由于水没有被缓冲，pH值和得到的A260/A280比值可能变化很大。pH值越低，A260/A280比值越低。

结果分析

DNA浓度

DNA浓度应通过分光光度计测量260 nm (A260) 处的吸光度来确定。DNA在260 nm处有显著吸收峰，吸光度读数应在0.1至1.0，如果不在此范围，则需要稀释或浓缩样品。在260 nm处，1个单位的吸光度对应于每毫升50 μg的DNA (A260 = 1 → 50 μg/ml)。洗脱液中磁珠的残留可能会影响A260读数，但不会影响下游DNA的性能。

DNA样本浓度 = $50 \mu\text{g/mL} \times (\text{A260} - \text{A320}) \times \text{稀释倍数}$

DNA总量 = 浓度 × 样本体积 (mL)

DNA纯度

DNA纯度通过计算260 nm与280 nm处的校正吸光度之比来确定，即 $(\text{A260} - \text{A320}) / (\text{A280} - \text{A320})$ 。纯DNA的A260/A280比值为1.7-1.9。

DNA长度

DNA长度测定建议使用脉冲场电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 检测。

标准的PFGE条件：

用1%琼脂糖在0.5X TBE

脉冲变换时间：1-25 s

电泳时间：16 h

电压：6V/cm