



Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood

细胞、血液玻璃珠法高分子量核酸提取试剂盒

Cat. No. CW3702

产品简介

该试剂盒能够满足从全血、培养细胞样本中提取完整的高分子量DNA。试剂盒创新性地采用了优化的裂解液，将从样本中释放提取的DNA特异性结合到经过特殊修饰的核酸玻璃珠（Nucleic acid beads）表面，提取时间最快30 min（细胞样本30 min，血液样本约60 min），能够快速而高效的实现高分子量DNA的提取，提取的DNA长度大于50 kb，最大可到Mb。纯化的高分子量DNA产量和纯度高，下游适用于三代长读长测序、光学图谱技术和链读基因组组装等多种应用。

运输条件： 常温

储存条件： 2-30°C保存。

产品内容

Component	CW3702S 10 preps	CW3702M 50 preps
Buffer FG1	35 mL	175 mL
Buffer Lysis A	2 mL	10 mL
Buffer Lysis B	2 mL	10 mL
Nucleic Acid Enhancer	1 mL	5 mL
Buffer AW2 (concentrate)	3 mL	15 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0.14 mL	0.7 mL
RNase A (100 mg/mL)	0.07 mL	0.35 mL
Buffer TB	3 mL	15 mL
Nucleic acid beads	20 颗	100 颗
Container	10 个	50 个

自备仪器、耗材、试剂

1. 仪器: 4°C微型离心机 (带2mL转子)、恒温震荡仪、水平混匀仪
2. 耗材: 1.5和2 mL离心管 (低吸附、无DNase)、阔口枪头
3. 试剂: 10 mM PBS、无水乙醇 (100%)、异丙醇 (AR)。

实验前准备及重要注意事项

1. 血液样本应避免反复冻融, 否则会导致提取的DNA质量和得率下降
2. Buffer FG1和PBS在使用前放置在4°C冰箱保存。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer AW2中加入无水乙醇。
4. 离心机调至4°C。
5. 恒温震荡仪温度调至56°C。

起始材料选择的注意事项

血液样本

1. 本试剂盒可以处理新鲜和冷冻血液样本以及含有常见抗凝剂（EDTA、柠檬酸盐、肝素以及游离DNA管）处理后的血液样本。血液样本的提取以红细胞裂解步骤开始，这有助于获得高产量、高纯度和高质量的高分子量 DNA。但是，在红细胞裂解过程中，红细胞裂解液对白细胞有一定损伤。因此，尽量避免白细胞长期暴露于红细胞裂解液中，尽快执行红细胞裂解步骤。
2. 建议样本的起始量为500 μL ，如果起始体积 $> 500 \mu\text{L}$ ，样品将需要在较大的管中进行初始处理或分成若干个500 μL 等份，且该容器需要容纳3体积的红细胞裂解缓冲液。

细胞样本

1. 本试剂盒可以从新鲜和冷冻培养细胞（贴壁或悬浮）中提取高分子量DNA。
2. 细胞量控制在 1×10^6 ，细胞量过多会影响裂解效果。
3. 对于细胞样品的储存，建议将所需细胞数量均等份平分，离心成球，用液氮速冻，并在 -80°C 下储存。与慢速冷冻相反，快速冷冻可以确保细胞结构保持完整，并且受冷冻的影响最小。

操作步骤

血液样本

一、红细胞裂解

1. 取500 μL 新鲜血液于2 mL离心管（不要使用1.5 mL离心管）中，加入1.5 mL Buffer FG1（3倍样本体积量），盖上盖子，轻轻上下颠倒25-30次，放置于冰上10 min，冰浴后上下翻转混匀，再次置于冰上3-5 min。

注意：红细胞裂解液对白细胞有一定损伤；延长暴露于红细胞溶解的白细胞缓冲液可以导致结块，降低产量和降低溶解度洗脱的DNA。

2. 1000 g， 4°C 离心3 min，小心吸弃上清，保留含有15-20 μL 沉淀，将离心管放置于冰上。

注意：吸取上清时，请勿触碰沉淀，一定要保留15-20 μL 液体。

3. 加入1.5 mL Buffer FG1轻轻上下颠倒8-10次，置于冰上3 min。

4. 1000 g, 4°C离心3 min, 小心吸弃上清, 保留含有15-20 μL沉淀, 将离心管放置于冰上。
注意: 吸取上清时, 请勿触碰沉淀, 一定要保留15-20 μL液体。
5. 加入1.5 mL PBS, 轻轻上下颠倒8-10次。
6. 1000 g, 4°C离心3 min, 小心吸弃上清, 保留含有15-20 μL沉淀, 将离心管放置于冰上。
注意: 吸取上清时, 请勿触碰沉淀, 一定要保留15-20 μL液体。

二、白细胞裂解

1. 按下表配置细胞裂解混合液1

细胞裂解混合液1	
Buffer Lysis A (μL)	RNase A (μL)
165	5.5

2. 加入150 μL细胞裂解混合液(混合液需现配现用)1于上述离心管中, 轻轻上下颠倒8-10次, 室温放置2 min。
3. 按下表配置细胞裂解混合液2

细胞裂解混合液2	
Buffer Lysis B (μL)	Proteinase K (μL)
165	11

4. 加入150μL细胞裂解混合液(混合液需现配现用)2于上述离心管中, 轻轻上下颠倒8-10次, 56°C, 700 rpm放置10 min, 使得沉淀完全溶解。
注意: 通过调整转速, 可改变基因组片段的长度, 若沉淀未完全溶解, 可延长裂解时间或增加金属浴的转速, 直至完全溶解。
5. 加入75 μL Nucleic Acid Enhancer, 轻轻上下颠倒8-10次, 室温放置10 min。

三、DNA结合与洗脱

1. 使用干净的镊子向上述离心管中加入2颗Nucleic acid beads和275μL异丙醇, 置于水平混匀仪上20 rpm, 10 min。(水平混匀仪厂家推荐使用: 其林贝尔 SRT-303)
2. 结束后, 小心吸弃上清。
注意: 切勿用枪头触碰Nucleic acid beads, 一定要保留30-40 μL液体, 玻璃珠露出液面即可。
3. 加入500 μL Buffer AW2, 置于水平混匀仪上20 rpm, 2 min, 小心吸弃上清。
注意: 切勿用枪头触碰Nucleic acid beads, 一定要保留30-40 μL液体, 玻璃珠露出液面即可。

- 重复步骤3。
- 将上述Nucleic acid beads倒到装有2 mL 离心管的Container中，瞬时离心1 s。
- 将上述Container中的Nucleic acid beads倒入一个新的2 mL的离心管中，加入200 μL Buffer TB，56°C，300 rpm放置 5 min。

注意：Nucleic acid beads不可长时间处于干燥状态，可将Buffer TB提前加入2 mL离心管中。

- 结束后，将上述溶液（含Nucleic acid beads）全部倒入装有1.5 mL 离心管的Container中，12000 rpm转离心 30 s。
- 结束后1.5 mL离心管中即为肉眼可见的核酸沉淀，稍后可用阔口枪头吹打混匀，置于-20°C 冰箱保存备用。

细胞样本

一、红细胞裂解

- 取新鲜培养细胞用PBS溶液悬浮于2 mL离心管中，7000 rpm，离心10 min，去上清，将离心管放置于冰上。

注意：细胞量控制在 1×10^6 ，细胞量过多会影响裂解效果。

- 按下表配置细胞裂解混合液1。

细胞裂解混合液1	
Buffer Lysis A (μL)	RNase A (μL)
165	5.5

- 加入150 μL 细胞裂解混合液（混合液需现配现用）1于上述离心管中，轻轻上下颠倒8-10次，室温放置2 min。

注意：不要引入气泡。

- 按下表配置细胞裂解混合液2。

细胞裂解混合液2	
Buffer Lysis B (μL)	Proteinase K (μL)
165	11

- 加入150 μL 细胞裂解混合液（混合液需现配现用）2于上述离心管中，轻轻上下颠倒8-10次，56°C，700 rpm放置10 min，使得沉淀完全溶解。

注意：通过调整转速，可改变基因组片段的长度，若沉淀未完全溶解，可延长裂解时间或增加金属浴的转速，直至完全溶解。

- 加入75 μL Nucleic Acid Enhancer，轻轻上下颠倒8-10次，室温放置10 min。

二、DNA结合和洗脱

1. 使用干净的镊子向上述离心管中加入2颗Nucleic acid beads和275 μL 异丙醇，置于水平混匀仪上20 rpm，10 min（水平混匀仪厂家推荐使用：其林贝尔 SRT-303）。
2. 结束后，小心吸弃上清。
注意：切勿用枪头触碰Nucleic acid beads，一定要保留30-40 μL 液体，玻璃珠露出液面即可。
3. 加入500 μL Buffer AW2，置于水平混匀仪上20 rpm，2 min，小心吸弃上清。
注意：切勿用枪头触碰Nucleic acid beads，一定要保留30-40 μL 液体，玻璃珠露出液面即可。
4. 重复步骤3一次。
5. 将上述Nucleic acid beads倒到装有2 mL 离心管的Container中，瞬时离心1 s。
6. 将上述Container中的Nucleic acid beads倒入一个新的2 mL的离心管中，加入200 μL Buffer TB，56°C，300 rpm放置 5 min。
注意：Nucleic acid beads不可长时间处于干燥状态，可将Buffer TB提前加入2 mL离心管中。
7. 结束后，将上述溶液（含Nucleic acid beads）全部倒入装有1.5 mL离心管的Container中，12000 rpm转离心 30 s。
8. 结束后1.5 mL离心管中即为肉眼可见的核酸沉淀，稍后可用阔口枪头吹打混匀，置于-20°C冰箱中。

高分子量DNA样本的处理和储存

1. 高分子量基因组DNA具有一定的粘性的，温和的处理以及使用宽口径移液管尖端将有助于保持DNA分子的完整性。此外，还应使用低吸附的管子和吸头。
2. 试剂盒提供的洗脱缓冲液Buffer TB可以作为长期储存的缓冲液。如果DNA样品经常使用，建议将HMW样品保存在4°C;如需长期保存，请在-20°C保存且尽量避免反复冻融，并始终使用低吸附的管子防止DNA与管壁结合。

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 μg/mL × (A260-A320) × 稀释倍数

DNA总量=浓度×样本体积 (mL)

DNA纯度

DNA纯度通过计算260nm与280nm处的校正吸光度之比来确定, 即(A260-A320)/(A280-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: 6 V/cm