



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111197043 A

(43)申请公布日 2020.05.26

(21)申请号 202010042158.0

(22)申请日 2020.01.15

(71)申请人 深圳海普洛斯医学检验实验室  
地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街  
道松坪山路1号源兴科技大厦南座  
1106  
申请人 深圳市海普洛斯生物科技有限公司

(72)发明人 许明炎 张晓妮 沈广强

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有  
限公司 44281  
代理人 张海平 彭愿洁

(51)Int.Cl.  
C12N 15/10(2006.01)

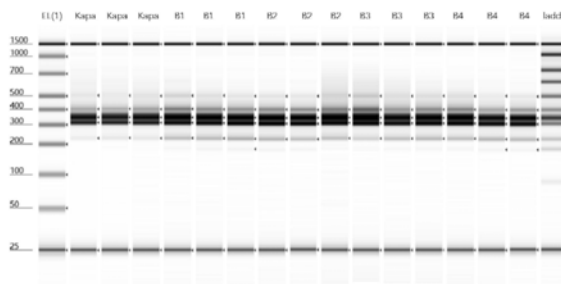
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种用于DNA分离的磁珠分选液及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种用于DNA分离的磁珠分选液,以51ml体积的该磁珠分选液计,包含1ml GE磁珠、5-10g PEG、12.5-50mg吐温20、50-125mmol NaCl、0.25-1mmol Tris、0.025-0.1mmol EDTA和0.085-0.34mmol HCl。本发明还提供制备该磁珠分选液的制备方法。该制备方法以GE磁珠为原料,包括GE磁珠清洗步骤和GE磁珠重悬步骤,具有操作简单、稳定、耗时短、成本低的优点。制得的磁珠分选液具有纯化DNA和片段化筛选的功能,能长期保持稳定,不需要进一步化学修饰,提高DNA分离纯化效率,可以替代进口磁珠,适用于大规模建库生产。



1. 一种用于DNA分离的磁珠分选液,其特征在于,以51ml体积的所述磁珠分选液计,包含1ml GE磁珠、5-10g PEG、12.5-50mg吐温20、50-125mmol NaCl、0.25-1mmol Tris、0.025-0.1mmol EDTA和0.085-0.34mmol HCl。

2. 根据权利要求1所述的磁珠分选液,其特征在于,所述PEG为PEG4000、PEG6000或PEG8000。

3. 一种制备根据权利要求1或2所述的磁珠分选液的制备方法,其特征在于,所述制备方法以GE磁珠为原料,包括以下步骤:

(1) GE磁珠清洗:用磁珠清洗液清洗所述GE磁珠,其中所述磁珠清洗液包含0.05体积%的吐温20和1mM Tris-HCl;

(2) GE磁珠重悬:将1ml经清洗的所述GE磁珠重悬在29.75ml预结合缓冲液中,然后加入20ml的25-50%PEG储液和0.25ml的5-20%吐温20储液,混合均匀,得到所述磁珠分选液,其中所述预结合缓冲液由25ml的2-5M NaCl储液、0.5ml的0.5-2M Tris储液、0.5ml的0.05-0.2M EDTA储液、0.17ml的0.5-2N HCl储液和3.58ml的水配制而成。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述GE磁珠清洗包括使所述GE磁珠在室温下平衡一段时间,震荡混匀,磁力分离所述GE磁珠,弃上清;然后加入所述磁珠清洗液清洗所述GE磁珠。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述平衡一段时间为平衡30min。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述加入所述磁珠清洗液清洗所述GE磁珠包括第一次清洗和第二次清洗,其中所述第一次清洗包括加入所述磁珠清洗液,震荡混匀,磁力分离所述GE磁珠,弃上清,所述第二次清洗包括再次加入所述磁珠清洗液,震荡混匀,磁力分离所述GE磁珠,弃上清。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,在所述第一次清洗和所述第二次清洗中,所述GE磁珠清洗液与所述GE磁珠的体积比为1:1。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述GE磁珠重悬包括向清洗后的所述GE磁珠加入1ml的所述预结合缓冲液中,震荡混匀,使所述GE磁珠重悬,短暂离心;将重悬的所述GE磁珠全部加入到28.75ml的所述预结合缓冲液中,震荡混匀;再加入所述PEG储液和所述吐温20储液,震荡混匀,得到所述DNA分离磁珠。

9. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述水为无核酸酶的水。

## 一种用于DNA分离的磁珠分选液及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测领域,具体涉及一种用于DNA分离的磁珠分选液及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 磁珠包裹有四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )磁性物质,因此具有超顺磁性,对外加磁场有较强的磁响应性。分散在溶液中的磁珠在外加磁场作用下,会被吸附到溶液容器的内壁上,而当撤去磁场后,磁珠又重新均匀分散于溶液中。基于这个性质,可以采用磁珠结合溶液中的某种成分,然后通过外加磁场吸附分离磁珠来达到分离该成分的目的。

[0003] 为了将磁珠用于结合DNA片段,在磁珠颗粒的表面上一一般修饰有特异性的基团,如羧基、羟基等功能基团。这些功能基团能选择性地结合靶标核酸,然后通过外加磁场吸附收集磁珠,最后用无核酸酶的水(简称无酶水)或TE缓冲液洗脱实现靶标核酸的分离。用磁珠分离DNA的一般步骤是,首先将样本DNA裂解形成DNA片段,接着加入磁珠分选体系使磁珠与DNA片段结合,然后施加磁场使结合了DNA片段的磁珠分离出来,再加入洗脱液使DNA片段从磁珠上洗脱下来,最后将包含DNA片段的溶液转移到另一个容器,得到纯化的DNA片段。

[0004] 磁珠分选体系主要包括磁珠、聚乙二醇(PEG)、盐离子( $\text{NaCl}$ )等。以羧基磁珠的分选体系为例,羧基磁珠表面带负电荷,DNA具有水溶性,表面呈负电荷,盐离子具有水溶性。PEG、盐离子与DNA分子竞争性地与水分子相结合,导致DNA分子脱水,DNA构象发生改变,并逐渐聚集形成沉淀。在盐离子作用下,DNA的磷酸基团与磁珠上的羧基形成离子桥,使DNA吸附在磁珠表面。最后通过磁力吸附及洗脱实现DNA的分离。

[0005] 就磁珠而言,目前NGS建库过程中使用的DNA分离磁珠主要有贝克曼XP磁珠和Kapa磁珠两种。这两种磁珠依靠进口,货期长,价格高,而且包装也不灵活,不利于自动化规模化建库生产。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有进口磁珠货期及成本方面的不足,提供一种用于DNA分离的磁珠分选液及其制备方法。该制备方法具有操作简单、稳定、耗时短、成本低的优点,制得的磁珠分选液能长期保持稳定,不需要进一步化学修饰,提高DNA分离纯化效率,可用于大规模建库生产。

[0007] 具体地,本发明的目的通过以下技术方案来实现:

[0008] 在第一方面,本发明提供一种用于DNA分离的磁珠分选液,以51ml体积的该磁珠分选液计,包含1ml GE磁珠、5-10g PEG、12.5-50mg吐温20、50-125mmol  $\text{NaCl}$ 、0.25-1mmol Tris、0.025-0.1mmol EDTA和0.085-0.34mmol  $\text{HCl}$ 。

[0009] 进一步地,该PEG为PEG4000、PEG6000或PEG8000。

[0010] 在第二方面,本发明提供一种制备本发明第一方面的磁珠分选液的制备方法,该制备方法以GE磁珠为原料,包括以下步骤:

[0011] (1) GE磁珠清洗:用磁珠清洗液清洗该GE磁珠,其中该磁珠清洗液包含0.05体积%的吐温20和1mM Tris-HCl;

[0012] (2) GE磁珠重悬:将1ml经清洗的该GE磁珠重悬在29.75ml预结合缓冲液中,然后加入20ml的25-50%PEG储液和0.25ml的5-20%吐温20储液,混合均匀,得到该磁珠分选液,其中该预结合缓冲液由25ml的2-5M NaCl储液、0.5ml的0.5-2M Tris储液、0.5ml的0.05-0.2M EDTA储液、0.17ml的0.5-2N HCl储液和3.58ml的水配制而成。

[0013] 在本发明的具体实施方案中,25-50%PEG储液可以例如包含25%、30%、35%、40%、45%或50%PEG,或者它们之间的任何数值的PEG。

[0014] 在本发明的具体实施方案中,5-20%吐温20储液可以例如包含5%、10%、15%或20%吐温20,或者它们之间的任何数值的吐温20。

[0015] 在本发明的具体实施方案中,2-5M NaCl储液可以例如包含2M、3M、4M或5M NaCl,或者它们之间的任何数值的NaCl。

[0016] 在本发明的具体实施方案中,0.5-2M Tris储液可以例如包含0.5M、1M、1.5M或2M Tris,或者它们之间的任何数值的Tris。

[0017] 在本发明的具体实施方案中,0.05-0.2M EDTA储液可以例如包含0.05M、0.1M、0.15M或0.2M EDTA,或者它们之间的任何数值的EDTA。

[0018] 在本发明的具体实施方案中,0.5-2N HCl储液可以例如包含0.5N、1N、1.5N或2N HCl,或者它们之间的任何数值的HCl。

[0019] 进一步地,在步骤(1)中,该GE磁珠清洗包括使GE磁珠在室温下平衡一段时间,震荡混匀,磁力分离GE磁珠,弃上清;然后加入磁珠清洗液清洗GE磁珠。通常,震荡混匀的时间为30s,但可根据时间情况缩短或延长震荡混匀时间。

[0020] 进一步地,该平衡一段时间通常为平衡30min,但不限于平衡30min,可根据实际情况缩短或延长平衡时间。磁珠正常保存在4℃,在该较低的温度下磁珠富集核酸的能力较低,平衡到室温后可以明显提升核酸富集能力。

[0021] 进一步地,该加入磁珠清洗液清洗GE磁珠包括第一次清洗和第二次清洗,其中第一次清洗包括加入磁珠清洗液,震荡混匀,磁力分离GE磁珠,弃上清,第二次清洗包括再次加入磁珠清洗液,震荡混匀,磁力分离GE磁珠,弃上清。通常,震荡混匀的时间为30s,但可根据实际情况缩短或延长震荡混匀时间。通常,磁力分离GE磁珠通过磁力吸附GE磁珠2min来实现,但可根据实际情况缩短或延长磁力吸附时间。

[0022] 进一步地,在第一次清洗和第二次清洗中,GE磁珠清洗液与GE磁珠的体积比为1:1,但可以根据实际情况增减GE磁珠清洗液与GE磁珠的体积比,通常适当增大GE磁珠清洗液的比例,以实现充分清洗。

[0023] 进一步地,在步骤(2)中,该GE磁珠重悬包括向清洗后的GE磁珠加入1ml的预结合缓冲液中,震荡混匀,使GE磁珠重悬,短暂离心;将重悬的GE磁珠全部加入到28.75ml的预结合缓冲液中,震荡混匀;再加入PEG储液和吐温20储液,震荡混匀,得到该DNA分离磁珠。

[0024] 进一步地,在步骤(2)中,所用的PEG为PEG4000、PEG6000或PEG8000,优选PEG8000。

[0025] 在第二方面,本发明提供一种DNA分离磁珠,该DNA分离磁珠通过本发明第一方面的制备方法制得。

[0026] 本发明的制备方法使经清洗的GE磁珠处于本发明人设计的由预结合缓冲液、PEG

和吐温20组成的溶液体系中,使制得的DNA分离磁珠具有纯化DNA和片段化筛选的功能。预结合缓冲液主要是盐缓冲液,PEG在这种体系中,可与DNA竞争水分子,导致DNA分子构象急剧变化,由线状压缩成卷曲球状,继而聚集沉淀。本发明人设计了预结合缓冲液缓冲体系的盐离子浓度变化范围和PEG的浓度变化范围,通过改变盐离子浓度和PEG浓度,可以选择性地沉淀不同长度的DNA。

[0027] 同时,PEG作为特定分子量大分子(例如PEG4000、PEG6000或PEG8000),与盐离子共同作用于DNA分子,改变DNA分子构象,并改变缓冲体系的粘稠程度,使磁珠在该体系中处于悬浮状态,不易沉降,增加磁珠与DNA分子在空间位置的碰撞概率,增加DNA聚集效率。另外,PEG与蛋白质具有相溶性,可以去除样本中蛋白质杂质。

[0028] 本发明的有益效果:

[0029] 本发明人针对进口的DNA分离磁珠货期长、价格高的问题,提出了一种以价格低廉的GE磁珠为原料制备新型的DNA分离磁珠的方法,具有操作简单、稳定、耗时短、成本低的特点。本发明制得的DNA分离磁珠能长期保持稳定,不需要进一步化学修饰,提高了DNA的纯化效率,可用于大规模建库生产,满足NGS建库生产的需要。

[0030] 本发明与现有技术相比具有以下优点:DNA纯化和片段筛选实验显示,本发明的DNA分离磁珠对DNA的富集效果优于进口磁珠产品;本发明的DNA分离磁珠既可用于DNA纯化,也可用于NGS实验中文库的片段化筛选;本发明的DNA分离磁珠成本很低,相对于市售产品可大大节约成本。

## 附图说明

[0031] 图1显示本发明试验例中本发明磁珠分选液B1、B2、B3、B4与Kapa磁珠在对DNA ladder进行两次分选后的安捷伦4200峰图的比较。

## 具体实施方式

[0032] 下面通过具体实施例和试验例并结合附图对本发明作进一步详细说明。应说明的是,这些实施例和试验例是示例性的,并不意在以任何方式限制本发明。

[0033] 实施例1:DNA分离磁珠的制备

[0034] 本实施例中用到的试剂主要包括:GE磁珠、聚乙二醇(PEG)、乙二胺四乙酸(EDTA)、HCl、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、吐温20、NaCl、无酶水。这些试剂是可以市售获得的。

[0035] 为制备DNA分离磁珠,先配制各种试剂不同浓度的储液,然后配制磁珠清洗液和预结合缓冲液。然后以GE磁珠为原料,进行GE磁珠清洗和GE磁珠重悬,制备DNA分离磁珠。

[0036] 1. 各种试剂的储液的配制:

[0037] (1) Tris储液:称取1.21g、2.42g、3.63g、4.84g Tris,溶于20ml无酶水中,配成0.5M、1M、1.5M、2M浓度的Tris储液。

[0038] (2) EDTA储液:称取0.335g、0.67g、1.005g、1.34g EDTA,溶于20ml无酶水中,配成0.05M、0.1M、0.15M、0.2M浓度的EDTA储液。

[0039] (3) HCl储液:吸取0.5ml、1ml、1.5ml、2ml浓HCl,将其缓慢加到10ml无酶水中,配成0.5N、1N、1.5N、2N浓度的HCl储液。

[0040] (4) NaCl储液:称取11.69g、17.53g、23.38g、29.22g NaCl,加入100ml无酶水中,制

成2M、3M、4M、5M浓度的NaCl储液。

[0041] (5) PEG储液:称取12.5g、15g、20g、25g PEG,溶于50ml无酶水中,配成25%、30%、40%、50%浓度的PEG储液;可根据需要选择PEG4000、PEG6000或PEG8000。

[0042] (6) 吐温20储液:吸取50 $\mu$ l、100 $\mu$ l、150 $\mu$ l、200 $\mu$ l吐温20,加入到800-950 $\mu$ l无酶水中,配成5%、10%、15%、20%浓度的吐温20储液。

[0043] 2. 磁珠清洗液的配制:

[0044] 首先,用0.4ml 0.5M Tris储液和0.147ml 0.5N HCl储液配制20ml pH 8.0的10mM Tris-HCl。取一个50ml离心管,加入19.9ml 10mM Tris-HCl,然后吸取100 $\mu$ l吐温20加入其中,混匀,制成10X磁珠清洗液。然后,取1ml 10X磁珠清洗液加入到9ml无酶水中,混匀,制成1X磁珠清洗液。

[0045] 3. 预结合缓冲液的配制:

[0046] 取一个50ml离心管,分别依次加入25ml选定浓度的NaCl储液、500 $\mu$ l选定浓度的Tris储液、500 $\mu$ l选定浓度的EDTA储液、170 $\mu$ l选定浓度的HCl储液和3.58ml无酶水,混匀,制成包含选定浓度的NaCl、Tris、EDTA、HCl的预结合缓冲液。

[0047] 4. GE磁珠清洗:

[0048] 从冰箱中取出GE磁珠原液,在室温下平衡30min,震荡混匀30s。取1ml GE磁珠原液加入到1.5ml离心管中,置磁力架上2min,弃上清。下架,加入1ml 1X磁珠清洗液,震荡混匀30s,上架2min,弃上清,完成第一次清洗。然后,下架,加入1ml 1X磁珠清洗液,震荡混匀30s,上架2min,弃上清,完成第二次清洗。

[0049] 5. GE磁珠重悬:

[0050] 向1ml清洗后的GE磁珠加入1ml以上配制的包含选定浓度的NaCl、Tris、EDTA、HCl的预结合缓冲液中,震荡混匀15s,使GE磁珠重悬,短暂离心。将重悬的GE磁珠全部加入到28.75ml的该预结合缓冲液中,震荡混匀30s。然后再加入20ml的选定浓度的PEG储液和0.25ml选定浓度的吐温20储液,震荡混匀30s,得到磁珠分选液,4 $^{\circ}$ C储存。

[0051] 试验例:磁珠分选液的分离筛选效果验证

[0052] 本试验例按实施例1制备的磁珠分选液与市售的Kapa磁珠对DNA ladder进行片段纯化及筛选试验,以比较和验证本发明的磁珠分选液的分离效果。

[0053] 本试验例中用到的TE Buffer和PEG Buffer获自Solarbio公司和Kapa公司,DNA ladder获自Invitrogen公司(Thermo Fisher)可以检测50bp-2,500bp的片段、包含50bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp和2500bp的DNA片段。

[0054] 实施例1制备的磁珠分选液设B1、B2、B3和B4四组,Kapa磁珠设一组,每组设三个重复。B1、B2、B3和B4具体配方如下:

组别		B1	B2	B3	B4
[0055] 预结合 缓冲液	NaCl	2 M	3 M	4 M	5 M
	Tris	0.5 M	1 M	1.5 M	2 M
	EDTA	0.05 M	0.1 M	0.15 M	0.2 M
	HCl	0.5 N	1 N	1.5 N	2 N
	PEG8000	25%	30%	40%	50%
	吐温 20	5%	10%	15%	20%

[0056] 具体的试验操作流程如下：

[0057] 1. 第一次分选

[0058] (1) 取一系列的1.5ml离心管，向每个离心管中分别加入2 $\mu$ l 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l的DNA ladder和48 $\mu$ l无酶水，并加入50 $\mu$ l实施例1制备的磁珠分选液或Kapa磁珠，做好标记，震荡混匀，瞬时离心，室温静置10min。

[0059] (2) 计时结束，将离心管置于磁力架2min，弃上清，加入80%乙醇溶液，洗两遍，晾干磁珠，加入100 $\mu$ l TE Buffer，震荡混匀，室温静置5min。

[0060] (3) 计时结束，向每个离心管中加入60 $\mu$ l PEG Buffer，震荡混匀，室温静置10min，获得上清液。

[0061] 2. 第二次分选

[0062] (4) 提前准备另一系列的1.5ml离心管，并分别加入20 $\mu$ l实施例1制备的磁珠分选液或Kapa磁珠，做好标记。待上述步骤(3)计时结束，将该另一系列的1.5ml离心管置于磁力架2min，取155 $\mu$ l上述步骤(3)获得的上清液到对应的离心管中，震荡混匀，短暂离心，室温静置10min。

[0063] (5) 计时结束，将离心管置于磁力架2min，弃上清，用80%乙醇，洗两遍，晾干磁珠，加入22 $\mu$ l无酶水，震荡混匀，瞬时离心，室温静置5min。

[0064] (6) 计时结束，将离心管置于磁力架2min，吸取上清液加入到对应编号的1.5ml离心管中，用Qubit荧光计(Invitrogen)测定DNA片段的Qubit浓度值，并用安捷伦4200检测DNA片段的大小，结果分别如表1和图1所示。

[0065] 表1：实施例1的磁珠分选液B1、B2、B3、B4与Kapa磁珠在对DNA ladder进行两次分选后的DNA分选效果的比较

重复	Qubit 浓度(ng/ $\mu$ l)				
	Kapa 磁珠	B1	B2	B3	B4
[0066] 1	3.14	4.36	4.44	4.86	4.32
2	2.84	4.40	4.24	3.54	3.98
3	3.22	4.42	4.68	3.94	3.92

[0067] 从表1的Qubit浓度值可以看出，在使用相同的试剂及操作流程的情况下，不同浓度配方的本发明磁珠分选液对DNA ladder进行两次分选后的Qubit浓度值都明显高于Kapa

磁珠,表明本发明的磁珠分选液的分选效果更好、更稳定。

[0068] 从图1的安捷伦4200峰图可以看出,本发明的磁珠分选液与Kapa磁珠所分选的片段大小都集中在300-400bp之间,表明本发明的磁珠分选液完全可以满足NGS建库生产。

[0069] 而且,从成本角度来看,本发明的磁珠分选液经过核算成本大约为2元/ml,而Kapa磁珠成本约为50元/ml,相比之下本发明的磁珠分选液每毫升可节约96%的成本。

[0070] 综上所述,本发明的磁珠分选液不仅能够取代Kapa磁珠进行NGS建库生产,还能大大降低生产成本,具有非常可观的应用前景。

[0071] 以上应用了具体实例对本发明进行了阐述,只是用于帮助理解本发明,并不用以限制本发明。本发明所属技术领域的技术人员依据本发明的构思,还可以做出若干简单推演、变形或替换。这些推演、变形或替换方案也落入本发明的权利要求范围内。

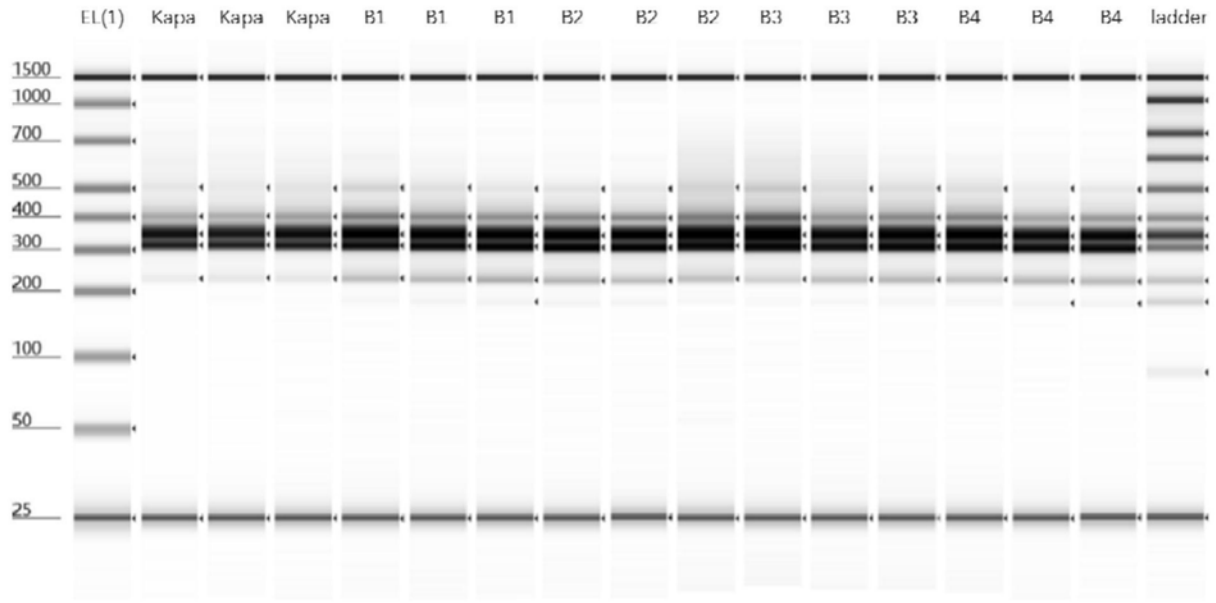


图1