
Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（磁珠法）

（Auto-Mag® X-Pure Size Select）

使用说明书（V-2.1）

产品目录号：S003-01, S003-02, S003-03, S003-04

目录

| | |
|----------------------------------------|---|
| 免责声明和安全信息----- | 1 |
| 产品介绍----- | 2 |
| 试剂盒组成成分和包装规格----- | 2 |
| 保存方法及注意事项----- | 2 |
| 试剂准备----- | 2 |
| 附加信息----- | 3 |
| Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）操作程序----- | 4 |
| PCR 扩增产物纯化操作步骤----- | 4 |
| DNA 片段分选和纯化操作步骤----- | 6 |
| NGS 文库制备接头二聚体清除操作步骤----- | 8 |
| 常见问题回答----- | 9 |

免责声明和安全信息

该试剂盒仅限研究使用。不可用于诊断目的。所有生物样本都具有潜在传染性。使用试剂盒时请务必穿着合适的实验外套，一次性手套和护目镜。如需了解更多信息，请查阅相应的材料安全数据表 (MSDS)。

产品介绍

Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）是一款基于顺磁珠技术开发的高性能试剂，专为满足下一代测序 (NGS) 文库构建中的 PCR 产物、DNA 片段和 RNA 的纯化需求而设计，同时支持 DNA 片段的大小分选与高效回收。在 PCR 产物纯化方面，该试剂提供了单管和 96/384 孔板两种灵活格式，通过优化的缓冲液选择性地结合 >100 bp 的 PCR 扩增产物，利用简便的清洗步骤去除多余引物、核苷酸、盐和酶，最终使用低盐洗脱缓冲液或水进行温和和高效的洗脱。在 DNA 片段大小分选中，用户可通过调整试剂与 DNA 样本的体积比，精准选择目标 DNA 片段范围，并通过结合、洗涤和洗脱的简单操作回收分布均匀、符合实验需求的目标 DNA 片段。

此外，Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂是经过严格的去 RNA 酶处理，也适合 RNA 的高效纯化与浓缩。所获得的高纯度 RNA 可直接应用于多种下游实验，包括 PCR 和 RT-PCR 反应、RNase 保护测定、RNAi 实验的转染、反义 RNA (aRNA) 扩增、微阵列探针制备、cDNA 合成与标记，以及 RNA-Seq 文库构建等。

Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂可兼容手工操作或自动化工作站的高通量操作。可靠和操作简便的特点，为实验室提供优化的纯化和分选解决方案，是分子生物学研究及 NGS 文库制备的理想选择。

产品特点

- 适合 DNA 的片段范围广：100 bp-10kb。
- DNA 片段回收率高达 90%以上。
- 操作快速简单，无需切胶，离心，自由选择分选 DNA 片段大小。
- 可适用于自动化、高通量纯化操作。
- 采用双面分选纯化 DNA 片段时，该试剂盒使用步骤和 Beckman AMPure XP 或同类产品高度一致，可直接替换。

试剂盒组成成分和包装规格

| 产品目录号 | S003-01 | S003-02 | S003-03 | S003-04 |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法） | 5 ml | 50 ml | 250 ml | 500 ml |

保存方法及注意事项

Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）是常温运输，收到后可储存在 2-8°C，有效期 12 个月。不要冷冻。

准备试剂

1. 准确配制 80% 乙醇（由无水乙醇制备，请勿使用工业乙醇）

注意：因为一般量筒精度偏差较大，不建议使用量筒配制。可采用称重方法配制。如配制好 100 毫升

80% 乙醇：称重 63.2 克（80 毫升）100% 无水乙醇，加入 20 克（20 毫升）去离子水。总重 83.2 克。即为 100 毫升 80% 乙醇。乙醇有吸湿性，随着时间的推移，乙醇会蒸发并吸收水分。80% 乙醇需新鲜配制，盖紧，一周内使用。

2. 洗脱缓冲液或去离子水。（Tris (10 mM, pH 8.0) or TE (10 mM Tris, pH 8.1 mM EDTA)）

附加信息

1. 无需磁分离装置手动操作，

在使用 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）进行操作时，各步骤需要兼容的磁分离装置来沉淀磁性颗粒。如果不使用磁分离装置的情况下的手动操作纯化，可以采用离心方法使磁性颗粒形成沉淀和液体分离。可以将样品管或 96 孔板离心 30 秒（单管：全速；96 孔板：3,000 x g。所有过程均在室温（15~25 °C）下进行。

Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）操作程序

用户自备材料和设备

- 采用单管形式纯化：无核酸酶 1.5~2.0 ml 管和磁分离架。
- 采用 96 孔板格式：96 孔 PCR 反应板，或容量为 300 微升圆底微量滴定板，或 1.2 ml 深孔微量滴定板和适当的磁分离装置。
- 96 孔板封板膜
- 用于自动化操作的磁珠纯化自动化平台
- 实验室混合器、涡流器或类似设备。
- 80% 乙醇（由无水乙醇制备。请勿使用工业酒精）。
- 洗脱缓冲液或去离子水。
- 校准良好的移液器和一次性移液器吸头。

操作前准备工作

- 配制 80% 乙醇。
- 使用前将 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂放置于室温平衡至少 30 分钟。
- 涡旋振荡悬浮液 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂。

PCR 扩增产物纯化操作步骤

该操作程序适用于 1.5 ml 小试管或 96 孔板。用于去除 PCR 扩增产物中 100bp 以下小片段 DNA，残留引物，核苷酸，引物聚合体等等。

1. 将 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂的磁珠完全悬浮以保证磁珠混匀。
2. 确定 PCR 样品体积，将待纯化样品加到 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板中。
3. 参考表 1，向样品加入适量的 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（磁珠法）。

表 1

| PCR 扩增样品体积（微升） | Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂（微升）* |
|----------------|-------------------------------|
| 10 | 18 |
| 20 | 36 |
| 25 | 45 |
| 50 | 90 |
| 100 | 180 |

*每次反应所需的 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂的量 = 1.8 X PCR 样品体积

4. 涡旋混匀 10 秒，或移液器吹打 10 次混匀。。

注意：如果使用 96 孔板和涡旋混匀，则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。

5. 室温放置 5 分钟。
6. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清后。
7. 小心吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
8. 保持样品在磁分离装置上，加入 200 微升新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，不必悬浮磁珠，室温温育 10 秒，吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 保持样品在磁分离装置上，室温下开盖 5 分钟以晾干磁珠。

注意：完全除去所有的液体是非常重要的。必要时用移液器除去残余液体。

11. 取下磁分离装置上的 1.5 毫升小离心管或样品板，加入 20~50 微升去离子水。涡旋混匀 20 秒，或移液器吹打 20 次重新悬浮的磁性颗粒。
12. 室温放置 5 分钟。
13. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板重新放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清。
14. 用移液器转移上清液到新的 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板。纯化回收的 PCR 产物可放置 -20C 储存，或用于后续的实验。

DNA片段分选和纯化操作步骤

进行 DNA 片段长度双面分选，需要进行两轮分选操作。第一轮是执行大片段截断，将大于指定选择区域上限的片段结合到磁珠。保留包含低于指定选择区域上限大小的所有片段上清液，做为第二轮分选的起始溶液。第二轮是执行小片段截断，将大于指定选择区域下限以上的所有片段结合到磁珠，而低于指定选择区域下限的片段则留在上清液中并被丢弃。此时，所需指定选择区域范围内的片段结合在磁珠上，经过洗涤和洗脱步骤，获得指定区域大小的 DNA 片段。为获得不同大小分布的 DNA 片段。参见表 2 推荐的 DNA 片段分选区域和 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（磁珠法）用量比例。

表2: DNA 双面分选片段大小选择Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（磁珠法）用量比例

| DNA 片段平均长度(bp) | 150-220 | 200-300 | 250-320 | 280-350 | 300-400 | 400-550 | 500-700 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 第一轮分选试剂用量比例 | 1.0x* | 0.9x | 0.8x | 0.7x | 0.6x | 0.55x | 0.5x |
| 第二轮分选试剂用量比例 | 0.2x | 0.2x | 0.2x | 0.2x | 0.2x | 0.15x | 0.15x |
| 总比例 | 1.2x | 1.1x | 1.0x | 0.9x | 0.8x | 0.7x | 0.65x |

* 是 Auto-Mag® DNA 片段分选纯化回收试剂对样品体积的倍数

样品准备

- DNA 样品应为双链 DNA 片段，并溶解在分子生物学级水或低盐缓冲溶液中。
- 为获得最佳结果，样品体积应 ≥ 50 微升。体积越小，移液精度越低，因此选择点的变异性就越大。
- 对于左侧大小选择，大多数 DNA 片段分布应大于所选截止点。
- 对于右侧大小选择，大多数 DNA 片段分布应小于所选截止点。
- 对于双侧大小选择，大多数 DNA 片段分布应位于选择点之间，一般来说，DNA 片段的范围不得小于 100 bp，也不得大于 800 bp。

1. 将 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂的磁珠完全悬浮以保证磁珠混匀。
2. 将 50 微升样品加到 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板中。如果样品不足 50 微升，用去离子水补足至 50 微升。
3. 根据所选择的回收DNA片段大小范围，参考表 2，第一轮分选比例，计算第一轮分选所需的Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（磁珠法）用量。加入到样品中。

例如：对于250-320bp片段选择，50微升样本 * 0.8 比例=40微升。需取40 微升Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂加入到样品中。

4. 涡旋混匀 10 秒，或移液器吹打 10 次混匀。室温放置 5 分钟。
注意：如果使用 96 孔板和涡旋混匀，则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。
5. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清后。
注意：加入的Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂比率越高，磁珠需要澄清的时间就越长。
6. 保持样品在磁分离装置上，小心吸取所有的上清液体（约 90 微升）。转移到新的 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板中。
注意：吸取液体时请勿触及或携带出管壁上的磁珠颗粒。

7. 参考表 2 第二轮分选比例，计算第二轮分选所需的Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂的用量。并加入到样品中。

例如：对于250-320bp 片段选择，50微升样本 * 0.2 比例 = 10微升。需取10 微升 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂加入到第 6 步骤取得的上清液中。

8. 涡旋混匀 10 秒，或移液器吹打 10 次混匀。室温放置 5 分钟。

注意：如果使用 96 孔板和涡旋混匀，则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。

9. 将样品放置于适当的磁分离装置上静置 2-5 分钟，或待溶液完全澄清后，小心吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。

10. 保持样品在磁分离装置上，加入 200 微升新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，不必悬浮磁珠，室温温育 10 秒，吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。

11. 重复步骤 10 一次。

12. 保持样品在磁分离装置上，室温下开盖 5 分钟以晾干磁珠。

注意：完全除去所有的液体非常重要。必要时用移液器除去残余液体。

13. 取下磁分离装置上的 1.5 毫升小离心管或样品板，加入 20~50 微升去离子水。涡旋混匀 20 秒，或移液器吹打 20 次重新悬浮的磁性颗粒。

14. 室温放置 5 分钟。

15. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板重新放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清。

16. 用移液器转移上清液到新的 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板。纯化回收的 DNA 分选产物可放置 -20C 储存，或用于后续的实验。

NGS 文库制备接头二聚体清除操作步骤（适用于单管和 96 孔板）

NGS 文库制备过程中，可形成游离的接头二聚体。如果不去除，接头二聚体会竞争和干扰链接接头的靶基因片段的结合和测序扩增，显著降低测序效率和质量。Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（磁珠法）提供了一种快速便捷的方法来去除 NGS 文库制备过程中接头二聚体。

1. 将 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂的磁珠完全悬浮以保证磁珠混匀。
2. 确定 NGS 文库接头链接反应样品体积，将待纯化样品加到 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板中。
3. 参考表 3，向样品加入适量的 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂。

表 3

| NGS 文库接头链接反应样品体积（微升） | Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂（微升）* |
|----------------------|------------------------------|
| 20 | 18 |
| 25 | 22.5 |
| 30 | 31.5 |
| 50 | 45 |
| 65 | 58.5 |

*每次反应所需的 Auto-Mag® DNA片段分选纯化回收试剂的量 = 0.9 × 样品体积

4. 涡旋混匀 10 秒，或移液器吹打 10 次混匀。
注意：如果使用 96 孔板和涡旋混匀，则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。
5. 室温放置 5 分钟。
6. 将 1.5 毫升小离心管或 96 孔板放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清后。
7. 小心吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
8. 保持样品在磁分离装置上，加入 200 微升新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，不必悬浮磁珠，室温温育 10 秒，吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 保持样品在磁分离装置上，室温下开盖 5 分钟以晾干磁珠。
注意：完全除去所有的液体是非常重要的。必要时用移液器除去残余液体。
11. 取下磁分离装置上的 1.5 毫升小离心管或样品板，加入 20~50 微升去离子水。涡旋混匀 20 秒，或移液器吹打 20 次重新悬浮的磁性颗粒。
12. 室温放置 5 分钟。
13. 将 1.5 毫升小离心管或 96 孔板重新放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清。
14. 用移液器转移上清液到新的 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板。纯化的靶基因片段产物可放置 -20°C 储存，或用于后续的实验。

常见问题回答

请参考下列列表解决纯化过程所碰到的问题。如需进一步帮助，请通过电话联系技术支持。若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

| 现象 | 产生原因 | 建议方法 |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 纯化回收率低 | 通过分光光度法吸光度测量回收率。这会导致回收率看起来不符合实际情况。 | 在琼脂糖凝胶上运行样品以仔细检查回收率测量值或使用定量双链 DNA 测定试剂，例如 PicoGreen 测定。 |
| | 磁珠丢失 | 如果在去除上清液的过程中磁珠被吸到吸头中，与这些磁珠结合的核酸也会丢失。缓慢吸出并尽可能多地去除上清液，而不干扰磁珠。 |
| | 试剂混合不充分 | 在磁珠结合混合和洗脱混合过程中需充分混合。以确保磁珠充分重悬。 |
| | 反应体积过大 | 大体积反应可以延长的结合和分离间。将结合时间增加至 10 分钟，并确保在去除上清液之前磁珠已充分靠壁。 |
| | 洗脱体积过低 | 洗脱体积小会导致回收率降低。这是因为少量的洗脱缓冲液总是留在包被磁珠后面。增加洗脱体积。 |
| 片段大小选择不正确 | 样品/试剂体积比例不对 | 使用本手册中概述的体积比。 |
| | 用于洗涤步骤的乙醇浓度不足 | 使用新鲜配制的 80% 乙醇。随着时间的推移，乙醇通过蒸发和吸收大气中的水而变得更加稀释。因此，部分 DNA 沉淀进入溶液，DNA 片段被洗掉。 |
| | 磁珠干燥过度 | 室温下干燥磁珠的时间不要超过 15 分钟。过度干燥可能会导致洗脱效率降低。 |
| 干扰后续应用 | 乙醇残留 | 确保在最后的洗涤步骤后除去所有乙醇。在室温下干燥磁珠 5~10 分钟。 |
| 磁珠残留 | 磁分离时间太短 | 增加分离时间，使磁珠完全被磁分离装置吸引。 |