

离子交换磁珠 (MSP-ZEW) 产品简述

- 静电吸引吸附核酸，静电排斥洗脱核酸；需优化吸附时 pH 和离子强度
- 中性聚合物包裹 Fe_3O_4 纳米磁芯(黑色)，真空粒径 $\sim 0.60\ \mu\text{m}$ ，水相 $\sim 1.0\ \mu\text{m}$
- 兼性离子对修饰表面；再加优化比例脂肪族羧基、脂肪族氨基和/或咪唑
- 系列产品：不同亚型表面阴离子空间分布不同，对短链核酸选择性不同
- 系列产品：不同亚型表面两性解离基团的比例不同，有各自不同的 pIm
- MSP-ZEWA (pIm ~ 5.5)、MSP-ZEWE (pIm ~ 5.5)和 MSP-ZEWC (pIm ~ 6.8)
- 常见水溶性蛋白非特异吸附弱，提核酸需灭活核酸酶、无需变性去蛋白
- 吸附核酸前，如未用表面活性剂或变性剂、加热处理，则不会破坏细胞
- 在 pH 3.3 分离阴离子 $\sim 50\ \mu\text{mol/g}$ 磁珠；室温下，耐受 pH 在 2.8 到 11.0
- 磁珠 pIm 与目标物质 pIs 差距 >1.0 、洗脱 pH 宜距 pIm 和 pIs 都尽可能远
- 分离等电点或解离常数 pIs 满足要求的物质，核酸、硫酸多糖、水溶蛋白
- 吸附：吸附 pH 在 pIs 与 pIm 间、与 pIm 相差 >0.50 、靶物质及磁珠稳定
- 洗脱：洗脱 pH 需适合后续分析、适合维持磁珠和目标物质的稳定性
- ZEWE 提血浆、血清、羊水中 cfDNA，短片段回收效力高于长片段
- ZEWC 在 pH ~ 3.2 吸附核酸时，对核酸片段的长度基本没有选择性
- 分散后悬浮稳定性好、磁响应快；阴离子分离容量稳定(批间波动 $<6\%$)

性能/规格

指标/特征	性能数据/性状
保存液	20 mM PBS, pH 7.4, 0.09%叠氮钠, 0.1%抗氧化剂
产品形态	中性缓冲液，混悬液
保质期	2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、不开封、避光保存；保质期不短于 24 个月
分离效价	在 pH 4.4, 酸性红 13 (二价阴离子) 分离量 $\sim 50\ \mu\text{mole/g}$ ；详见质检报告
应用特点	在 pH 3.0 到 11.0 间，仅需调节 pH，对适用目标物质基于静电吸引而强吸附、基于静电排斥而高效洗脱；基于离子交换快速分离/浓缩目标物质
应用提示	MSP-ZEWE 优势在于提取短链核酸(cfDNA 及 microRNA)，及亚硫酸氢钠处理 DNA 检测甲基化 DNA；MSP-ZEWC 提取长链核酸效力高于其他亚型

应用过程示例

MSP-ZEW 系列磁珠，在 pH ~ 3.0 时静电吸引吸附核酸、pH >8.6 时静电排斥洗脱核酸，但对阴离子无选择性；表面有兼性离子对修饰层，对蛋白非特异吸附很弱故提取核酸时无需变性蛋白。ZEWE 及 ZEWC 适合提取 cfDNA、microRNA 及亚硫酸氢钠处理 DNA，ZEWC 对长链核酸回收率更好，但二者提取核酸得率受吸附 pH、磁珠用量、离子强度等影响。如需变性蛋白裂解细胞再提取核酸，可尝试 $\sim 3\ \text{M}$ 胍盐但不宜用 SDS。

一、试剂、器材

1. 适合血浆样品

1.1 吸附缓冲液：(血浆或血清或其它)样品加 3 倍体积吸附缓冲液后 pH 在 2.9~3.1；

1.2 洗涤缓冲液：洗涤液 I 用前加 1.5 倍体积的无水乙醇；洗涤液 II 直接使用；

2. 其他样品(粪便、血清、羊水等，缓冲液需自行配置并优化；以下是推荐配方)

2.1 吸附缓冲液：50 mM 甲酸，pH ~2.5 (样品加 3 倍吸附缓冲液，调 pH 到 2.9~3.1)；

2.2 洗涤液 I：50 mM 甲酸，pH ~2.5；用前加 1.5 倍无水乙醇，pH 应为 2.9~3.1；

2.3 洗涤液 II：50 mM 甲酸-甲酸钠，pH 2.9 ~ 3.1；

3. 蛋白酶 K：冻干粉，用前水溶解到 20 g/L (对组织样品需考虑中性变性剂或盐酸胍)；

4. 洗脱缓冲液：10~100 mM Tris-HCl, pH 8.6 ~ 8.9；

5. 旋涡振荡器、四维混合仪、滚轴混合器、磁分离架、移液器、EP 管等。

二、应用过程示例：提取血浆 cfDNA 为例；各组分量按比例减少或增加

1. 降解蛋白/核酸酶：在 1.5 ml 离心管中加 300 μ L 血浆、10~30 μ L Proteinase K (20 g/L)；旋涡混匀，室温(25 $^{\circ}$ C)静置 5.0~10 分钟(无需加热)，并每隔 2.0 min 涡旋混匀 1 次。

2. 吸附核酸：向蛋白酶 K 处理样品加 900 μ L 吸附缓冲液，混匀，加 10 ~ 60 μ L MSP-ZEWB 悬液(用洗涤液 II 洗涤后重悬到 50 g/L, 0.5~3.0 mg)，室温持续震荡(吸附) 2.0 ~ 7.0 min。

3. 磁力回收磁珠(吸附核酸)：保留磁珠及所吸附 cfDNA、去除未吸附物质

(1)移液器或低速离心将 EP 管内盖及管壁液体全部转移到管底；(2)用磁力将管内磁珠完全贴附在管壁(~1.5 min)；(3)保持外部磁力，移除上清液(避免移液器吸嘴接触磁珠)。

4. 洗涤去非特异吸附：洗去磁珠表面非特异吸附物质、去除所吸附脂类物质

(1)磁珠加 400 μ L 洗涤液 I，温和混合 10 s 或移液器缓慢吹打磁珠 20 次；(2)将 EP 管内壁液体用移液器转移到底部悬液中；(3)用磁力将 EP 管内磁珠全部贴附在管壁，保持磁力移去上清液；(4)用 400 μ L 洗涤液 I，再温和洗涤 1 次；(5)换用洗涤液 II，每次 400 μ L，洗涤 2 次。

5. 核酸洗脱：静电排斥洗脱磁珠表面吸附的核酸

(1)去除外部磁力，在含磁珠 EP 管中加入 ~40 μ L 洗脱液(0.60 mg 磁珠需洗脱液约 30 μ L；减小洗脱液用量有利于提高洗脱液中核酸浓度)，涡旋震荡 10 s 或用移液器吹打磁珠 20 次至分散均匀；(2)室温保持 5.0 min，期间每隔 1.0 min 震荡混合 1 次。

6. 核酸转移：去除洗脱液中磁珠，转移 DNA 备测试

(1)移液器或低速离心将磁珠转移到底部；(2)磁力将磁珠贴附在管壁，保持磁力将上清液转移至另外的容器，获得目标物质(转移过程中，避免移液器吸嘴接触磁珠)。

三、应用提示

1. 裂解细胞不能用 SDS，可尝试终浓度 >3.0 M 盐酸胍或 <1% 的中性表面活性剂。

2. MSP-ZEW 系列磁珠耐受 pH~2.5 室温处理 2.0 小时，但 56 $^{\circ}$ C pH 2.5 时则消磁。

3. MSP-ZEW 系列磁珠对分离核苷酸、核酸及其它阴离子时选择性很低。

4. MSP-ZEW 系列磁珠性能表征，代表文献见：

(1). Int J Bio Macromol 2018; 120: 2234-41 (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.020>)

(2). Data in Brief 2018; 21:709-720 (<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.09.102>)

附录 1: 两性解离微米磁珠磁珠产品规格及货号

产品名称	产品型号	产品货号	产品规格	产品形式
核酸提取磁珠 (两性解离离子交换磁珠; 专利产品)	MSP-ZEWB	18040206-0050g	1.0 mL*50g/L (50 mg)	悬液, 塑料管
		18040206-0500g	10.0 mL*50g/L (500 mg)	悬液, 塑料瓶

附录 2: 两性解离微米磁珠设计思路

生物样品中核酸含量低, 且样品中的抑制性杂质干扰后续的 PCR 酶反应及二代测序, 需从样品中提取/纯化核酸再分析。磁分离是提取核酸关键技术。核酸易解离成阴离子, 但核酸与经典阴离子交换剂结合后温和条件下难洗脱, 苛刻洗脱液与后续分析不兼容。用硅醇成氢键能吸附提取核酸, 但其吸附核酸弱、短片段回收率低、核酸盐吸附强故阳离子易干扰。

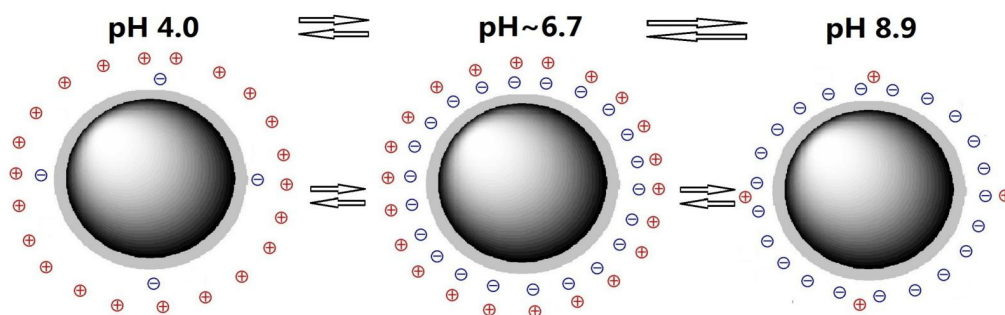


图 S1 MSP-ZEW 系列表面净电荷随着 pH 变化

博蓝鹰生物建立微纳米材料表面亲水修饰专利技术(中国发明专利 ZL201610963764.X, 授权日 2017-10-17, PCT 国际申请号: PCT/CN2017/082374; 美国专利已授权, 欧洲、日本在实审中); 在修饰后磁珠表面同时添加解离成正电荷及解离成负电荷基团, 得两性解离微米磁珠 MSP-ZEW 系列(图 S1), 其表面净电荷为零 pH 为等电点 pI_m 。优化 MSP-ZEW 表面两类解离基团比例, 使其在 pH 3.0~3.3 间表面正电荷足够多且随 pH 变化小、在 pH ~9.0 时负电荷足够多; 故磁珠在酸性 pH 下吸附核酸、在碱性 pH 下洗脱核酸, 在弱碱性 pH 下吸附阳离子而在酸性 pH 下洗脱阳离子。控制上述解离基团分布使磁珠表面在 pH 3.3 时表面电荷分布有特殊规律: 正电荷聚集在腔穴内而周围分布负电荷得 ZEWB 亚型, 适合选择性吸附短片段核酸; 在腔穴内生成兼性离子对而周围生成分布正电荷得 ZEWC 亚型, 对长链核酸收率提高。MSP-ZEWA 及 MSP-ZEWB 都适合快速分离微量水溶蛋白; MSP-ZEWC 能快速去除白蛋白。此类 MSP-ZEW 离子交换剂结构及用显色探针标定其离子交换容量的技术, 已获得中国发明授权 (专利号: ZL201711010305.0, 授权日 2019-02-26; 国际申请号 PCT/2018/111536, 欧盟专利已授权。

经 pH 3.3 吸附 pH 8.9 洗脱, MSP-ZEWB 提取质粒超过 10 mg/g 磁珠。如在 0.20 ml (pH 3.6) 吸附体系含 0.4 μ g 纯化质粒并用 40 μ l 缓冲液(pH 8.9)洗脱, 0.20 mg MSP-ZEWB 所得质粒量(A_{260})接近 1.0 mg Dynabeads Myone Silane 所得质粒量的 1.5 倍, 但定量 PCR 发现上述 MSP-ZEWB 所得质粒 PCR 扩增效率接近 1.0 mg Dynabeads Myone Silane 所得质粒的 3.0 倍。

MSP-ZEW 系列磁珠提取核酸效力受到样品中其它阴离子竞争结合、多价金属离子中和核酸电荷等因素的负干扰。针对不同样品, 需优化样品预处理方法, 避免用阴离子表面活性剂。

MSP-ZEW 系列磁珠纯化蛋白得率较高; 经碱及盐洗脱再生后可重复使用 16 次以上。MSP-ZEW 系列磁珠, 在 pH 2.5 室温保持 60 min 后仍能保持顺磁性(不消磁)。

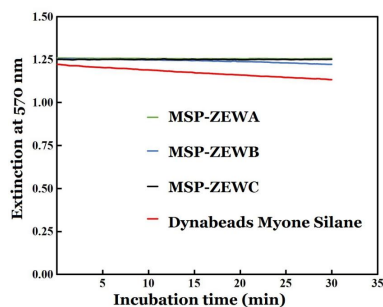
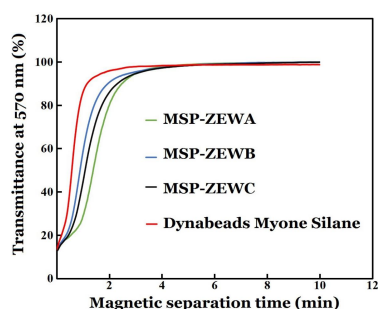
附录 3: 两性解离离子交换磁珠的性能表征

S3.1 离子交换磁珠基本物理参数

非特异吸附: 在 pH 7.4 时, 对水溶性大肠杆菌碱性磷酸酶几乎无非特异吸附

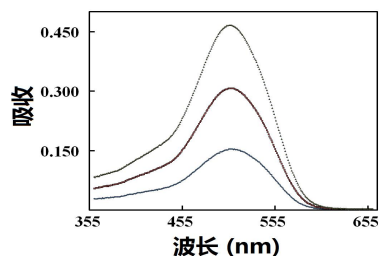
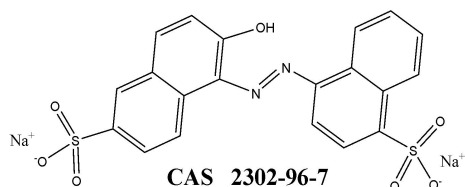
悬浮稳定性: 在 30 min 内沉降可忽略, 比 Dynabeads Myone Silane 更优

磁响应速度: 相同磁场下 Dynabeads Myone Silane 分离 99% 时能达到 >96% 分离



S3.2 离子交换磁珠分离显色探针的性能

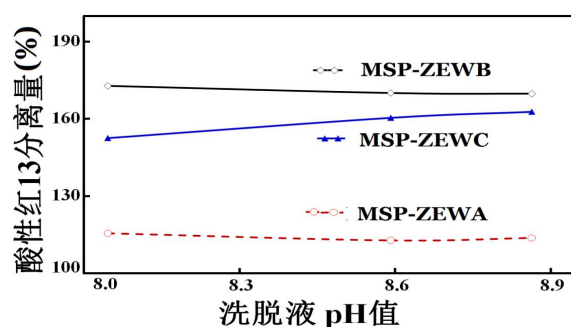
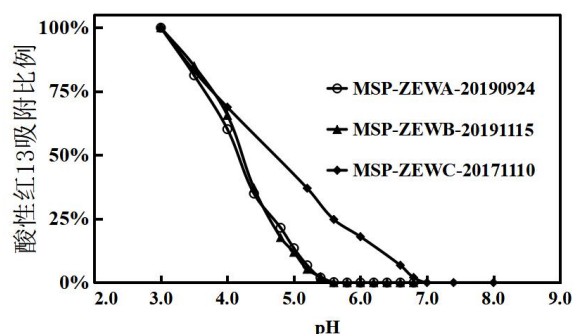
S3.2.1 酸性红13结构和吸收光谱



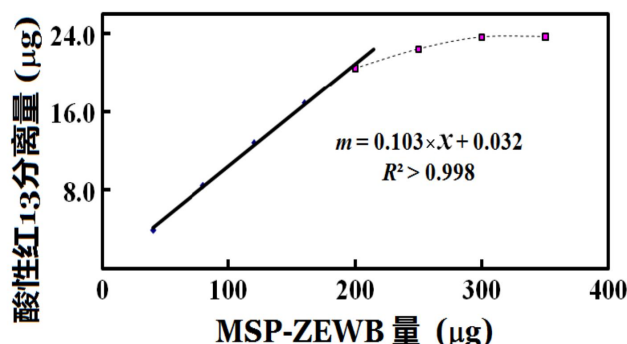
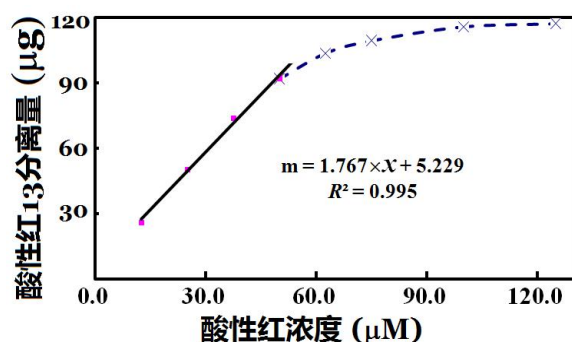
S3.2.2 分离容量测定体系 (如未另作说明, 则测定条件如下)

- (1) 吸附体系 0.80 ml 结合缓冲液(pH 3.3), 55~60 μ mol/L 酸性红13, 所标示量洗涤后磁珠;
- (2) 漩涡震荡混匀, 室温吸附10 min; 磁力保留磁珠, 用结合缓冲液洗涤磁珠3次, 每次0.20 ml;
- (3) 磁珠加洗脱缓冲液 0.80 ml (pH 8.9), 四维混合仪持续混合或间隙漩涡震荡, 室温洗脱10 min;
- (4) 取0.70 ml洗脱液, 测506 nm 吸收, 按18.0 (mM) $^{-1}$ ·cm $^{-1}$ 换算成酸性红13分离量。

S3.2.3 吸附体系和洗脱液pH对分离容量的影响：需优化吸附pH以提升容量及重现性



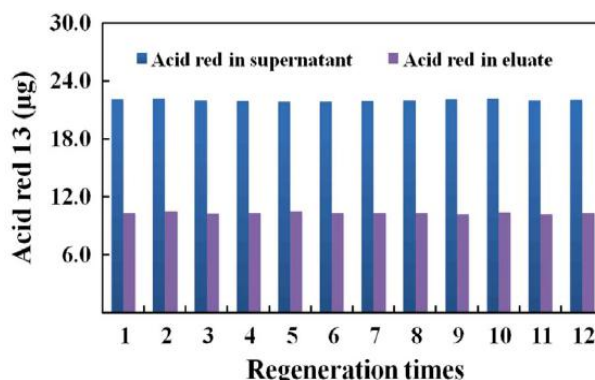
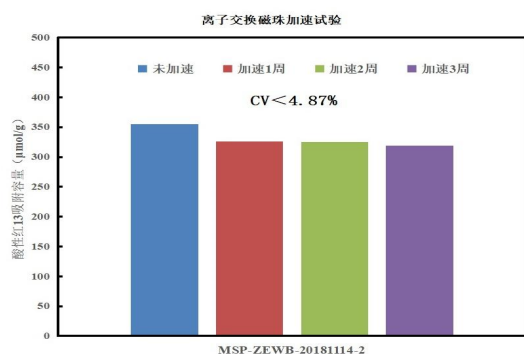
S3.2.4 酸性红13分离量对吸附体系磁珠用量及酸性红13浓度的响应



S3.2.5 离子交换磁珠的加速老化试验及再生能力

将离子交换磁珠在 37 度，饱和湿度的条件下加速 1-3 周，测定其加速后对酸性红 13 的吸附容量，结果显示，离子交换磁珠加速 1-3 周后对酸性红 13 的吸附容量的 CV<5%(图左)。

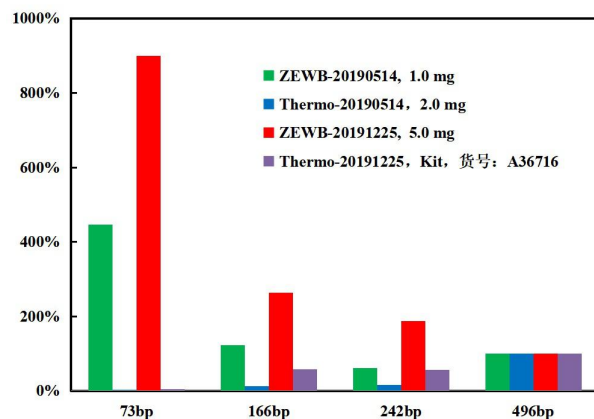
用吸附缓冲液及洗脱缓冲液交替洗涤再生 12 次，分离酸性红效力不变(图右)。



S3.2.6 离子交换磁珠分离核酸的片段长度选择性

MSP-ZEWB 对水溶蛋白非特异吸附低，提取细胞外游离核酸时仅需用蛋白酶 K 故耐受残留细胞干扰，提取效力强于硅醇磁珠，适合血浆、血清、羊水中循环非细胞 DNA (Circulating cell-free DNA, cfDNA)。需长时间保存所提取的 cfDNA 则宜变性蛋白，可尝试终浓度>3.0 M 盐酸胍。

MSP-ZEWB 对短片段核酸的选择性明显强于长片段核酸 (下图)，属于提取短片段磁珠。



附录 4. MSP-ZEWB 提取 HPV DNA 的第三方测试数据

测试人: RDXXX /RDXXX; 测试日期: 2016.10.14~10.18; 测试地点: 上海实验室

S4.1 测试方法及对象

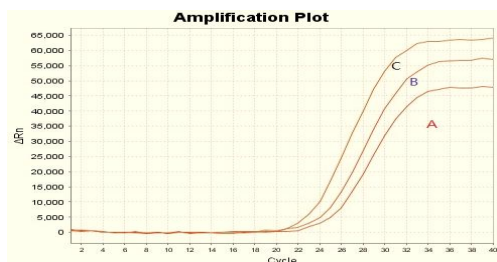
提取宫颈脱落细胞中核酸, 用 HPV 内参引物扩增, qPCR 检测 HPV 基因。

A: 离心柱法; B: Dyna 磁珠法 (Thermo); C: MSP-ZEWB 磁珠法 (FlyW&Y)。

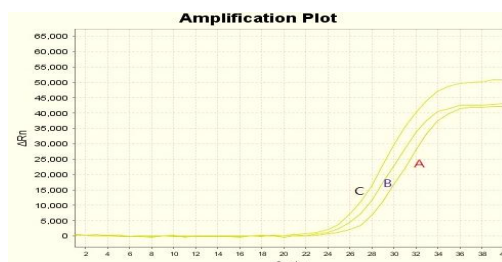
S4.2 实验结果

1、不同厂商磁珠与离心柱法提取效率对比

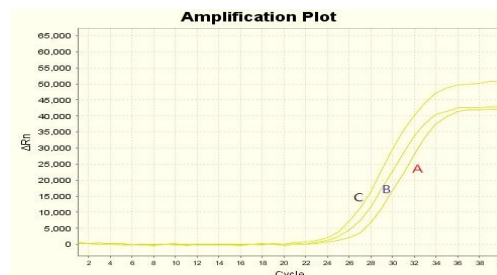
提取效率: MSP-ZEWB 磁珠法 > Dyna 磁珠法 > 离心柱法。



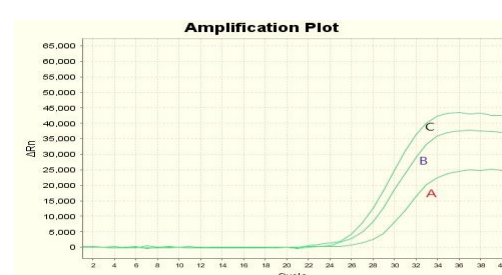
样本 1



样本 2



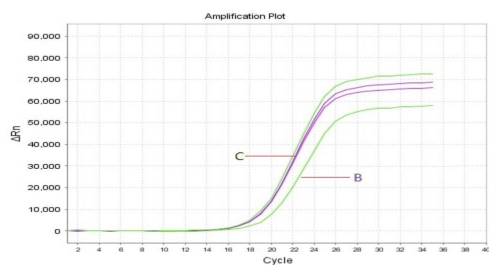
样本 3



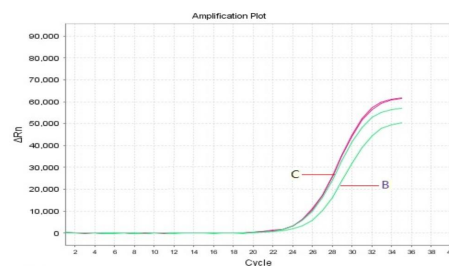
样本 4

2、不同批次 MSP-ZEWB 磁珠样品提取核酸效率的比较

提取效率: MSP-ZEWB 磁珠法 > Dyna 磁珠法; 目测三批磁珠批间 Ct 值 CV < 5%;



样本 1



样本 2

S4.3 实验结论

- 1、优化磁珠法提取条件，MSP-ZEWB 磁珠法对 HPV 提取效率不逊于 Dyna 磁珠法 (Thermo) 及离心柱法，通过持续优化后，具有较强的应用性。
- 2、三个批次 MSP-ZEWB 对 HPV 样本提取结果显示批间差较小，能够满足要求。
- 3、目前仅测试提取 HPV 核酸；优化提取条件预期 MSP-ZEWB 磁珠法有应用拓展性。