

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案 1：血液类 DNA 的抽提方案(需暂停)-----	5
方案 2：干血片/拭子 DNA 抽提方案(无暂停)-----	7
常见问题回答-----	12

版本: 2016-10

简介

MagPure Universal DNA KF Kit 为抗凝血液、血清、血浆、唾液、干血片、培养细胞以及组织的 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher Flex、KingFisher Duo 上使用。该方法纯化的 DNA 包括基因组 DNA，线粒体 DNA，病毒 DNA(如乙肝)，或其它寄生微生物的 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR，病毒 DNA 检测等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的磁性粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计的，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。其它提取仪或移液工作站也可以使用。

MagPure Universal DNA KF Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品在裂解液和蛋白酶的作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和其它杂质，再经含乙醇洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Elution Buffer)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

组 成

MagPure Universal DNA KF Kit

产品编号	MD5105-00	MD5105-01	MD5105-02
纯化次数	24 次	50 次	200 次
MagPure Particles N	0.5 ml	1.1 ml	4.5 ml
Buffer ATL	10 ml	15 ml	60 ml
Buffer AL	10 ml	15 ml	60 ml
Buffer BD*	3 ml	5 ml	20 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	96 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8ml	15 ml
Buffer LW1	40 ml	80 ml	250 ml
Elution Buffer	3 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

注：Buffer BD 使用前须用无水乙醇进行稀释。

保 质 期

本产品可以在室温下(15-25℃)保存 18 个月。Proteinase K 干粉和 MagPure Particles N 室温下运输和保存，长期贮藏(>3 个月)，把 Proteinase K 干粉保存于-20~8℃，MagPure Particles N 保存于 2~8℃，MagPure Particles N 不能冻藏，结冰会破坏磁珠结构。

准备工作

- 70%乙醇
- 无水乙醇
- KingFisher 核酸提取仪和配套的耗材
- 多道移液枪试剂槽
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 -20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- Buffer BD 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- MagPure Particles N 初次使用时, 必须摇晃 1 分钟让磁珠充分分散。

方案 1. 血液等液体样品的 DNA 的提取(需暂停)

该方案适合于从 200 μ l 抗凝血液，血清，血浆，唾液，拭子浸泡液等样品中直接提取 DNA。

A1: KingFisher Flex

- 按下表将样品和试剂转移 DW Plate 中，并用标签笔标下板的名称。

板的名称	96 孔板类型	试剂名称与用量
Elution	浅孔板	Elution Buffer: 60~100 μ l
Wash 4	深孔板	70~75% ethanol: 600 μ l
Wash 3	深孔板	70~75% ethanol: 600 μ l
Wash 2	深孔板	Buffer LW1: 600 μ l
Wash 1	深孔板	Buffer LW1: 600 μ l Comb(磁力套)
Sample Plate	深孔板	样品:200 μ l 样品类型: 全血、血浆、唾液、细胞重悬液、拭子浸泡液等样品
		Buffer AL: 200 μ l Proteinase K:20 μ l MagPure Particles N:20 μ l

- 启动 KingFisher Bindit 3.1 程序，导入 MD5105_F1 程序。
- 执行程序，按提示将装有样品或试剂的 96 孔板放到仪器对应的槽中。约 12 分钟后，机器暂停。
- 取出样品板(Sample Plate)，每孔加入 400 μ l Buffer BD(已用乙醇稀释)。
- 把样品板放回仪器中，继续启动程序。约 35 分钟后程序执行完毕。
- 取出 DNA 样品，用封口膜封好。把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

B1: KingFisher Duo

- 按下表将样品和试剂转移至 DW Plate 对应的孔中。

孔的名称	试剂
孔 H	Elution Buffer: 60~100μl
孔 G	空
孔 F (Wash 4)	70~75% ethanol: 600μl
孔 E (Wash 3)	70~75% ethanol: 600μl
孔 D (Wash 2)	Buffer LW1: 600μl
孔 C (Wash 1)	Buffer LW1: 600μl
孔 B	磁力套
孔 A (样品孔)	样品:200μl 样品类型: 全血、血浆、唾液、细胞重悬液、拭子浸泡液等样品
	Buffer AL: 200μl Proteinase K:20μl MagPure Particles N:20μl

- 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MD5105_D1 程序。
- 执行程序，约 12 分钟后，机器暂停。
- 取出 96 孔板，在孔 A 加入 400μl Buffer BD(已用乙醇稀释)。
- 把样品板放回仪器中，继续启动程序。约 35 分钟后程序执行完毕。
- 取出 DNA 样品，转移至 1.5ml 离心管中，把 DNA 保存于-20℃。

方案 2. 干血片/拭子/组织/细菌等样品 DNA 提取(无暂停)

该方案适合于血液/组织/拭子/血片/细菌等样品中提取 DNA。

A. 液体样品(血液、血浆、细胞重悬液、唾液等样品)

1. 取一块样品板(DW Plate),每加入 20 μ l Proteinase K 和 20 μ l MagPure Particles N。
2. 加入 200 μ l 血液、血浆、血清、细胞重悬液或其它液体样品。
3. 加入 200 μ l Buffer AL, 70 $^{\circ}$ C 振荡温育 10~13 分钟。

B. 保存的唾液样品

1. 取一块样品板(DW Plate),每加入 20 μ l Proteinase K 和 20 μ l MagPure Particles N。
2. 加入 400 μ l 已加保存的唾液样品, 室温或 65 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。

C. 干血片 (FTA Card 或其它干血片)

1. 用打孔器在 FTA Card 或干血片上打出 1~3 个 6mm 直径的血片, 并转移 2.0ml 离心管中。
2. 加入 20 μ l Proteinase K 和 300~350 μ l Buffer ATL 至样品中, 55 $^{\circ}$ C 高速振荡温育 30~60 分钟。短暂离心, 转移所有的消化液至样品孔中。
3. 再加入 100 μ l Buffer AL 至样品孔中。

D. 干拭子样品

1. 转移拭子样品至 2.0ml 离心管中, 去除拭子柄。加入 20 μ l Proteinase K 和 450~600 μ l Buffer ATL 至样品中。65 $^{\circ}$ C 振荡温育 30 分钟。若需提取拭子样品的难裂解的细菌 DNA, 再 90 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟进一步裂解细菌)
2. 短暂离心, 转移 400~450 μ l 消化液至样品孔中。

E. 湿拭子样品

1. 10,000 x g 离心 1 分钟收集细胞，吸弃部分保存液，余下 200ul 保存液和拭子。
2. 加入 20μl Proteinase K 和 200μl Buffer ATL 至样品中。65°C 振荡温育 30 分钟。若需提取拭子样品的难裂解的细菌 DNA，再 90°C 温育 15 分钟进一步裂解细菌)
3. 短暂离心，转移小于 450μl 消化液至样品孔中。:

F: 动物组织(1~10mg 动物组织)

1. 把 1~10mg 动物组织样品转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 20μl Proteinase K 和 200μl Buffer ATL。55°C 振荡温育 60 分钟或直至样品完全消化。
3. 加入 200μl Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。70°C 水浴 10 分钟。
4. (可选) 12,000 x g 离心 3 分钟，转移 400μl 消化液至样品孔中。

G: 石蜡切片组织

1. 转移石蜡切片至 1.5ml 离心管中。加入 20μl Proteinase K 和 250μl Buffer ATL 至样品中。65°C 温育 60 分钟，90°C 温育 60 分钟。
2. 10,000 x g 离心 3 分钟，转移 200~250μl 消化液至样品中。
3. 加入 200μl Buffer AL 至样品孔中。

H: 细菌类样品

1. 取 0.5~1.0ml 培养液于 10,000 x g 离心 3 分钟收集细菌，去除培养液。
2. 加入 200μl Buffer ATL，涡旋重悬细菌，90°C 温育 15 分钟裂解细菌。
5. 加入 200μl Buffer AL 和 20μl Proteinase K 至样品中，涡旋混匀 15 秒。70°C 水浴 10 分钟。

A2: KingFisher Flex

1. 按下表将样品和试剂转移 DW Plate 中，并用标签笔标下板的名称。

板的名称	96 孔板类型	试剂名称与用量
Elution	浅孔板	Elution Buffer: 60~100μl
Wash 4	深孔板	70~75% ethanol: 600μl
Wash 3	深孔板	70~75% ethanol: 600μl
Wash 2	深孔板	Buffer LW1(已加乙醇): 600μl
Wash 1	深孔板	Buffer LW1(已加乙醇): 600μl Comb(磁力套)
Sample Plate	深孔板	样品消化液: 350~500μl
		MagPure Particles N:20μl Buffer BD: 400μl

2. 启动 KingFisher Bindit 3.1 程序，导入 MD5105_F2 程序。
3. 执行程序，按提示将装有样品或试剂的 96 孔板放到仪器对应的槽中。
4. 约 35 分钟后程序执行完毕。
5. 取出 DNA 样品，用封口膜封好。把 DNA 保存于-20°C。

B2: KingFisher Duo

1. 按下表将样品和试剂转移至 DW Plate 对应的孔中。

孔的名称	试剂
孔 H	Elution Buffer: 70~100μl
孔 G	空
孔 F (Wash 4)	70~75% ethanol: 600μl
孔 E (Wash 3)	70~75% ethanol: 600μl
孔 D (Wash 2)	Buffer LW1: 600μl
孔 C (Wash 1)	Buffer LW1: 600μl
孔 B	磁力套
孔 A (样品孔)	样品消化液: 350~500μl
	MagPure Particles N:20μl
	Buffer BD: 400μl

2. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MD5105_D2 程序。
3. 约 35 分钟后程序执行完毕。
4. 取出 DNA 样品，用封口膜封好。把 DNA 保存于-20°C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员可随时为您提供服务，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。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
DNA 有颜色	
Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合	Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。样品与蛋白酶 K 先进行混匀后，才能加入 Buffer AL。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
血液贮藏条件不正确	血液样品因贮藏条件不对，出现凝固块。用移液枪吸打几次打散血液样品的凝固块。
DNA 产量低	
样品中细胞或病毒含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩于 250μl。
Buffer BD 没有加入乙醇稀释	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率

Note: