

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 1：200 μ l 血液 DNA 的 KingFisher Flex 抽提方案	5
方案 2：200 μ l 血液 DNA 的 KingFisher DUO 抽提方案	6
方案 3：200 μ l 血液 DNA 的 KingFisher ML 抽提方案	7
常见问题回答	8

版本: 2014-10

简介

MagPure Blood DNA KF Kit 为抗凝血液、浓缩血液、白膜层、淋巴细胞重悬液、唾液等液体样品 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 ML、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。吸附了核酸的纳子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 Blood 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(Buffer TE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

组 成

MagPure Blood DNA KF Kit

产品编号	MD5111-01	MD5111-02	MD5111-03
纯化次数	50 次	200 次	500 次
MagPure Particles	1.1 ml	4.4 ml	11 ml
Buffer BL	15 ml	50 ml	120 ml
Buffer BD*	6 ml	25 ml	50 ml
Proteinase K	24 mg	84 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	10 ml	20 ml
Buffer BW1 *	44 ml	110 ml	2 x 154 ml
Buffer BW3	50 ml	150 ml	400 ml
Elution Buffer	20 ml	50 ml	120 ml
说明书	1	1	1

注：Buffer BD 和 Buffer BW1 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 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 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 BW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- 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 初次使用时, 必须剧烈摇晃 1-2 分钟让磁珠充分分散。

方案 1. 200 μ l 血液样品在 KingFisher Flex 的提取

该方案适合于从 200 μ l 抗凝血液，浓缩血液，白膜层、淋巴细胞重悬液等样品中直接提取 DNA。

- 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	板类型	试剂名称与用量
Elution	浅孔板	Elution Buffer B: 70~150 μ l (根据样品进行调整，处理白膜层和淋巴细胞重悬液时，洗脱体积建议为 100~150 μ l)
Wash 4	深孔板	Buffer BW3: 600 μ l
Wash 3	深孔板	70% ethanol(Buffer BW2): 600 μ l
Wash 2	深孔板	Buffer BW1(已加乙醇): 600 μ l
Wash 1	深孔板	Buffer BW1(已加乙醇): 600 μ l MagPure Particles: 20 μ l Comb(磁力套)
Sample Plate	深孔板	1. 先加入 20 μ l Proteinase K 2. 然后加入 200 μ l Buffer BL 3. 最后加入 200 μ l 样品。

- 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Blood_DNA_Std_FL 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)**。
Buffer BD 使用前须用无水乙醇进行稀释。
- 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。

若需节省耗材成本和减少操作次数，可省略 Wash 4 的洗涤步骤。此时导入 MagPure_Blood_DNA_Economic_FL 程序进行操作。实验表明，对于多数的 PCR 检测应用，如地平检测等，省略 Wash 2 洗涤步骤不会影响结果。

方案 2. 200 μ l 血液在 KingFisher Duo 的提取

该方案适合于从 200 μ l 抗凝血液，浓缩血液，白膜层、淋巴细胞重悬液等样品中直接提取 DNA。

- 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
洗脱条	Elution Buffer B: 70~150 μ l (根据样品进行调整, 处理白膜层和淋巴细胞重悬液时, 洗脱体积建议为 100~150 μ l)
孔 H	空
孔 G(Wash 5)	Buffer BW3: 600 μ l
孔 F (Wash 4)	70% ethanol: 600 μ l
孔 E (Wash 3)	70% ethanol: 600 μ l
孔 D (Wash 2)	Buffer BW1(已加乙醇): 600 μ l
孔 C (Wash 1)	Buffer BW1(已加乙醇): 600 μ l MagPare Particles: 20 μ l
孔 B	磁力套
孔 A (样品孔)	1. 先加入 20 μ l Proteinase K 2. 然后加入 200 μ l Buffer BL 3. 最后加入 200 μ l 样品。

- 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Blood_DNA_Duo 程序。
- 把装好试剂和磁力套的 DW Plate 放在仪器中，执行程序。
- 约 12 分钟后，机器暂停。
- 取出 DW Plate。在孔 A 中加入 400 μ l Buffer BD(已用乙醇稀释)。Buffer BD 使用前须用无水乙醇进行稀释。
- 把样品槽放回仪器中，继续启动程序。约 35 分钟后程序执行完毕。
- 取出 DNA 样品，把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 3. 200 μ l 血液在 KingFisher ML 的提取

该方案适合于从 200 μ l 抗凝血液，浓缩血液，白膜层、淋巴细胞重悬液等样品中直接提取 DNA。

1. 在 1.5ml 离心管中，先加入 20 μ l Proteinase K 和 200 μ l Buffer BL。
2. 转移 200 μ l 抗凝血液，浓缩血液，白膜层、淋巴细胞重悬液等样品至装有蛋白酶和 Buffer BL 的离心管中。高速涡旋混匀 20 秒。70°C 水浴 10 分钟。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴，把消化液转移至样品孔中。
4. 按下表将样品和试剂转移至 5 联管对应的孔中。

板的名称	试剂
第 5 个孔(洗脱孔)	Elution Buffer B: 70~150 μ l
第 4 个孔(洗涤液 3)	Buffer BW3: 600 μ l
第 3 个孔(洗涤液 2)	70% ethanol: 800 μ l
第 2 个孔(洗涤液 1)	Buffer BW1(已加乙醇): 800 μ l MagPure Particles: 20 μ l
第 1 个孔(样品孔)	400 μ l Buffer BD 420 μ l 消化液 (第三步)

5. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Blood_DNA_ML 程序。
6. 把试剂条和磁力套装在仪器中。执行程序。
7. 把样品架放回仪器中，继续启动程序。约 35 分钟后程序执行完毕。
8. 取出 DNA 样品，把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。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 的技术人员也可以随时为您提供服务，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 BL 不能预先混合	Proteinase K 与 Buffer BL 不能预先混合。样品与蛋白酶 K 先进行混匀后，才能加入 Buffer BL。
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 250 μ l。
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℃。
Buffer BW1 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率