

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:组织/细胞/血液 DNA 提取方案	5
方案 2: 拭子/唾液 DNA 提取方案	9
常见问题回答	11

版本: 2014-01

简介

MagPure Tissue DNA KF Kit 为抗凝血液、组织和培养细胞等样品 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 Tissue 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。

保质期

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

组 成

MagPure Tissue DNA KF Kit

产品编号	MD5112-00	MD5112-01	MD5112-02	MD5112-03
纯化次数	24 次	50 次	200 次	500 次
MagPure Particles	0.6 ml	1.2 ml	4.5 ml	11 ml
RNase A	5 mg	10 mg	30 mg	90 mg
Buffer ATL	10 ml	15 ml	50 ml	120 ml
Buffer AL	10 ml	15 ml	50 ml	120 ml
Buffer MBD*	3 ml	5 ml	20 ml	50 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	96 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	3 ml	15 ml	30 ml
Buffer AW1 *	13 ml	22 ml	110 ml	220 ml
Buffer AE	5 ml	10 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

注：Buffer MBD 和 Buffer AW1 使用前须用无水乙醇进行稀释。

准备工作

- 70%乙醇
- 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。溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。
- Buffer AW1 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. 组织/细胞/血液 DNA 提取(常规方案)

该方案适合于从 $\leq 30\text{mg}$ 动物组织、培养细胞($\leq 5 \times 10^6$)或抗凝动物血液($\leq 200\mu\text{l}$)中直接提取高纯度的总 DNA。

A. 动物组织(2~30mg)

1. 把 2~30mg 组织样品(或 10mg 肝脏、肺或脾脏)剪切成碎片，并转移至 1.5ml 离心管中。加入 200 μl Buffer ATL 和 20 μl Proteinase K 至样品中。涡旋混匀，55 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温浴 1~3 小时。
2. 加入 10 μl RNase A 至消化液中，混匀。室温放置 15~30 分钟。
3. 把消化液转移至深孔板(DW Plate)。按第 4 步进行操作。

B. 培养细胞($\leq 5 \times 10^6$)

1. 计算细胞数量。2,000 \times g 离心 5 分钟收集细胞，小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 200 μl Buffer PBS，20 μl Proteinase K 和 10 μl RNase A 至细胞沉淀中。涡旋重悬细胞，室温静置 10 分钟。
3. 把样品转移至 DW Plate 中。按第 4 步进行操作。

C. 抗凝血液或其它液体样品(200 μl)

1. 在 DW Plate 中，每孔加入 20 μl Proteinase K。
2. 转移 200 μl 抗凝血液，浓缩血液、白膜层、淋巴细胞重悬液或其它液体样品至装有蛋白酶的孔中。
3. 按第 4 步进行操作。

A. KingFisher Flex 操作流程

4. 按下表把样品和试剂添加到对应的板中。

板的名称	板的类型	试剂
Elution	浅孔板	Buffer AE: 100~150 μl
Wash 3	深孔板	70% ethanol: 700 μl
Wash 2	深孔板	Buffer AW1(已加乙醇): 500 μl
Wash 1	深孔板	Buffer AW1(已加乙醇): 500 μl MagPure Particles: 20 μl Comb

Sample Plate	深孔板	1. Buffer AL: 200µl 2. 加入 200µl 组织消化液、细胞重悬液、全血、浓缩血液、淋巴细胞重悬液等样品
--------------	-----	---

- 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Tissue_DNA_FL 程序，执行程序，按提示将装有样品或其它试剂的 96 孔板放到仪器的槽中。
- 约 12 分钟后，机器暂停。取出样品板(Sample Plate)，**每孔加入 400µl Buffer MBD(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°C。

B. KingFisher Duo 操作流程

- 按下表将样品和试剂转移至 DW Plate 对应的孔中。

板的名称	试剂
洗脱条	Buffer AE: 100-200µl
孔 F, G, H	空
孔 E (Wash 3)	70% ethanol: 700µl
孔 D (Wash 2)	Buffer AW1(已加乙醇): 500µl
孔 C (Wash 1)	Buffer AW1(已加乙醇): 500µl MagPare Particles: 20µl
孔 B	磁力套
孔 A (样品孔)	1. Buffer AL: 200µl 2. 加入 200µl 组织消化液、细胞重悬液、全血、浓缩血液、淋巴细胞重悬液等样品

- 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Tissue_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。**在样品孔(孔 A)中加入 400µl Buffer MBD(已用无水乙醇稀释)**。
- 把样品放回仪器中，继续启动程序，约 20 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°C。

方案 2. 组织/拭子/唾液中提取 DNA 的简易方案

该方案适合于从 2~30mg 动物组织快速提取 DNA，方案采用提取仪进行消化，自动化程度更高。

A. 干拭子样品

1. 转移 1~2 个拭子样品至 2ml 离心管中，加入 350 μ l 灭菌水、350 μ l Buffer AL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋混匀，65 $^{\circ}$ C 温育 20~30 分钟。
2. 取 600 μ l 把消化液转移至深孔板(DW Plate)。按第 3 步进行操作。

B. 湿法保存拭子样品

1. 取 450 μ l 拭子浸泡液(含拭子)，加入 150 μ l Buffer AL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋混匀，65 $^{\circ}$ C 温育 20~30 分钟。
2. 取 600 μ l 把消化液转移至深孔板(DW Plate)。按第 3 步进行操作。

C. 唾液样品

1. 取 450 μ l 拭子浸泡液(含拭子)，加入 150 μ l Buffer AL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋混匀，65 $^{\circ}$ C 温育 30~60 分钟。
2. 取 600 μ l 把消化液转移至深孔板(DW Plate)。按第 3 步进行操作。

D. 组织样品

1. 把 20~40mg 组织样品剪切成碎片，并转移至 1.5ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋混匀，55 $^{\circ}$ C 振荡温浴 1~3 小时。
2. 加入 300 μ l Buffer AL 至样品中。涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。

A. KingFisher Flex 操作流程

1. 按下表把样品和试剂添加到对应的板中。

板的名称	板的类型	试剂
Elution	浅孔板	Buffer AE: 100~200 μ l
Wash 3	深孔板	70% ethanol: 700 μ l
Wash 2	深孔板	Buffer AW1: 500 μ l
Wash 1	深孔板	Buffer AW1: 500 μ l

		MagPure Particles: 20µl Comb
Sample Plate	深孔板	1. 600µl 消化液 2. 300µl 异丙醇

2. 启动 KingFisher Bindit 3.3，导入 MagPure_Tissue_DNA_Bind_FL 程序。
3. 执行程序，按提示将装有样品或其它试剂的 96 孔板放到仪器的槽中，约 40 分钟后，机器暂停。
4. 把样品板放回仪器中，继续启动程序。约 25 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°C。

B. KingFisher Duo 操作流程

1. 按下表将样品和试剂转移至 DW Plate 对应的孔中。

板的名称	试剂
洗脱条	Buffer AE: 100-200µl
孔 F, G, H	空
孔 E (Wash 3)	70% ethanol: 700µl
孔 D (Wash 2)	Buffer AW1(已加乙醇): 500µl
孔 C (Wash 1)	Buffer AW1(已加乙醇): 500µl MagPure Particles: 20µl
孔 B	磁力套
孔 A (样品孔)	1. 600µl 消化液 2. 300µl 异丙醇

2. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Tissue_DNA_Lyse_Duo 程序。
3. 把装好试剂和磁力套的 DW Plate 放在仪器中，执行程序。
4. 约 40 分钟后程序执行完毕。
5. 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 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℃。
DNA 产量低	
组织样品消化不彻底	动物组织最好使用玻璃匀浆器进行匀浆以提高消化效果。延长蛋白酶 K 消化时间。
组织样品消化后离心去除不消化的物质	若组织样品经 Buffer ATL 和蛋白酶 K 消化后仍有明显的颗粒，如尾巴和皮肤等，室温离心去除杂质后转移上清再进行操作。
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。
Buffer GW1 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。
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℃。
样品中 DNA 含量较低	不同的组织样品，其 DNA 含量较别很大。
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