

## 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/组织/细胞 DNA 手工单管式操作方案	5
方案 2: 血液/组织/细胞 DNA 的移液工作站方案	7
方案 3: 血液/组织/细胞 DNA 的 KingFisher Flex 方案	9
常见问题回答	12

版本: 2019-09

## 简介

MagPure Tissue&Blood DNA LQ Kit 为干血片、拭子、抗凝血液、血清、血浆、唾液、培养细胞、少量的动物组织和石蜡切片等生物样品 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，芯片分析、二代测序、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 LQ 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为移液工作站和手工提取而设计的。

MagPure Tissue&Blood DNA LQ 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

MagPure Tissue&Blood DNA LQ Kit 除 MagPure Particles 和 Proteinase K 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer ATL/Buffer AL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。MagPure Particles 和 Proteinase K 干粉在室温下运输。收到试剂盒后，把 Proteinase K 保存于-20~8℃。MagPure Particles 保存于 2-8℃。

## 组 成

### MagPure Tissue&Blood DNA LQ Kit

产品编号	D6314-01	D6314-02	D6314-03
纯化次数	48 次	96 次	5 × 96 次
MagPure Particles N	1.1 ml	2 × 1.1 ml	11 ml
Buffer ATL	20 ml	35 ml	160 ml
Buffer AL	20 ml	35 ml	160 ml
Buffer BD*	5 ml	15 ml	50 ml
Proteinase K	24 mg	48 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer BW1*	44 ml	66 ml	2 × 110 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	100 ml
说明书	1	1	1

## 准备工作

- 75%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。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 N 初次使用时, 必须剧烈摇晃 1 分钟让磁珠充分分散。

## 方案 1.单管式手工操作

该方案适合于从 200 $\mu$ l 抗凝血液、干血片、石蜡切片、拭子、培养细胞和微量动物组织样品中提取 DNA。

### 样品前处理:

#### A. 液体样品(血液、血清、血浆、细胞重悬液等样品)

1. 在 1.5ml 离心管中, 加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. **转移 200 $\mu$ l 血液、血浆、血清、细胞重悬液(<10<sup>6</sup>)或其它液体样品至装有蛋白酶 K/磁珠的离心管中。**振荡混匀 5 秒。
3. **加入 200 $\mu$ l Buffer AL, 颠倒混匀 1~3 次, 高速涡旋 15 秒。**70 $^{\circ}$ C 水浴或振荡温育 10 分钟。
4. **加入 400 $\mu$ l Buffer BD 和 20 $\mu$ l MagPure Particles N 至样品中。**颠倒混匀 20~30 次。室温静置 3 分钟, 其间颠倒混匀数次。按第 5 步进行操作。

#### B. 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 3 个 3mm 直径的血片, 并转移 2.0ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l Buffer ATL, 55 $^{\circ}$ C 振荡 (>900rpm)温育 30~60 分钟。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中, 70 $^{\circ}$ C 振荡 (>900rpm)温育 10 分钟。短暂离心, 转移消化液至新的 1.5ml 离心管中。
4. **加入 20 $\mu$ l MagPure Particles N 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。**颠倒混匀 20~30 次。室温静置 3 分钟, 其间颠倒混匀数次, 按第 5 步进行操作。

#### C. 动物组织(<10mg 动物组织)

1. 把<20mg 动物组织样品转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer ATL。55 $^{\circ}$ C 振荡温育>30 分钟或直至样品完全消化。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中, 涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. **加入 20 $\mu$ l MagPure Particles N 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。**颠倒混匀 20~30 次。室温静置 5 分钟, 其间颠倒混匀数次。按第 5 步进行操作。

#### D. 石蜡切片组织

1. 转移石蜡切片至 1.5ml 离心管中, 用二甲苯或代替物脱除石蜡。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer ATL 至样品中。55 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。90 $^{\circ}$ C

温育 60 分钟。

3. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 10 秒。
4. 加入 20 $\mu$ l MagPure Particle 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。颠倒混匀 20~30 次。室温静置 5 分钟，其间颠倒混匀数次。按第 5 步进行操作。

#### E. 拭子样品

1. 转移拭子至 2ml 离心管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中。**颠倒或涡旋混匀。65 $^{\circ}$ C 水浴 15~30 分钟。
2. **短暂离心，转移 400 $\mu$ l 消化液至新的 1.5ml 离心管中。**
3. **加入 400 $\mu$ l Buffer BD 和 20 $\mu$ l MagPure Particle N 至样品中。**颠倒混匀 20~30 次。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀数次。按第 5 步进行操作。

#### F. 唾液样品

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. **转移 400 $\mu$ l 唾液或其它液体样品至装有蛋白酶 K/磁珠的离心管中。**振荡混匀 5 秒。
3. 室温~65 $^{\circ}$ C 水浴或振荡温育 15~30 分钟。
4. **加入 400 $\mu$ l Buffer BD 和 20 $\mu$ l MagPure Particle N 至样品中。**颠倒混匀 20~30 次。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀数次。按第 5 步进行操作。

#### 纯化步骤

5. 转移至磁力架上吸附 5~6 分钟。倒弃或吸弃溶液。
6. **加入 500 $\mu$ l Buffer BW1，涡旋 15 秒重悬磁珠。**
7. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。倒弃或吸弃溶液。
8. 重复第 6~7 步一次。[处理石蜡组织、干血片、组织样品可以省略这一步]
9. **加入 500 $\mu$ l 75%乙醇，涡旋 15 秒重悬磁珠。**
10. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。倒弃或吸弃溶液。
11. 重复第 9~10 步一次。
12. 短暂离心收集管壁上的液滴，转移至磁力架上吸附 1 分钟，吸弃所有溶液。打开管盖，空气干燥 10 分钟。
13. 加入 15~100 $\mu$ l Elution Buffer，**涡旋打散磁珠。**60 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。若无振荡温匀，在涡旋 1~2 次加速 DNA 的溶解。转移至磁力架上吸附 5 分钟，把 DNA 转移至新的离心管中。

## 方案 2. 移液工作站流程设计

该方案适合于从抗凝血液、石蜡切片、干血片、培养细胞和组织样品中提取 DNA。由于不同的移液工作站的设置和配件都有所不同，请根据平台进行调整，以下流程是根据 Haminton 移液工作站而设计的。

### A. 全血/血浆/血清/细胞重悬液( $<10^6$ )等

1. 在 2.2ml 96 孔 Nunc 深孔板中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 20 $\mu$ l MagPure Particles。
2. **转移 200 $\mu$ l 血液、血清、血浆、细胞重悬液或液体样品至装有裂解液的孔中。**  
1,000~1,400rpm 振荡混匀 15 秒。
3. **加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中，65~70°C 振荡（1,000~1,400rpm）温育 10~13 分钟。**
4. **加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。**1,000~1,400rpm 振荡混匀 5 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】
5. 按第 7 步进行操作。

### B. 干血片 (FTA Card 或其它干血片)

1. [手工]用打孔器在 FTA Card 或干血片上打出 3~5 个 3mm 直径的血片，并转移至 96 孔板中。加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l Buffer ATL。贴上封口膜，55°C 振荡温育 60 分钟。
2. [手工]短暂离心收集管壁的液滴，撕去封口膜。加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中。贴上封口膜，1,000~1,200rpm 振荡混匀 3 分钟。70°C 水浴 10 分钟。
3. [手工]短暂离心收集管壁的液滴。[手工]用 8 通移液枪把所有消化转移至 Nunc 96 孔深孔板中，去除滤纸片。转移 96 孔板至仪器中。
4. [机器]加入 20 $\mu$ l MagPure Particles N 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。  
1,000~1,400rpm 振荡混匀 5 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】
5. 按第 6 步进行操作。

### C. 动物组织( $<10$ mg 动物组织)

1. [手工]把动物组织样品转移至 2.2ml 96 孔 Nunc 深孔板中。加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer ATL，贴上封口膜。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30 分钟或直至样品完全消化。
2. [手工]短暂离心收集孔壁上的液滴，小心去除封口膜。
3. 转移 96 孔板至移液工作站中。
4. [机器]加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中,70 $^{\circ}$ C 振荡(1400rpm)温育 15 分钟。
5. [机器]加入 20 $\mu$ l MagPure Particles N 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。1,000~1,400rpm 振荡混匀 5 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】
6. 第按 7 步进行操作。

#### D. 石蜡切片组织

1. [手工]转移石蜡切片至 1.5ml 离心管中，用二甲苯或代替物(Buffer DPS)脱除石蜡。
2. [手工]加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer ATL 至样品中。55 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。90 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
3. [机器]把 1.5ml 离心管转移至仪器中，并把消化液转移至 2.2ml 96 孔 Nunc 深孔板中。
4. [机器]加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中，1,000~1,200rpm 振荡混匀 1 分钟。
5. [机器]加入 20 $\mu$ l MagPure Particles N 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。1,000~1,400rpm 振荡混匀 5 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】
6. 第按 7 步进行操作。

#### E. 干拭子样品

1. [手工]转移拭子至 2ml 离心管中。加入 500 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中。颠倒或涡旋混匀。
2. [手工]室温~65 $^{\circ}$ C 水浴 15-30 分钟。
3. [手工]短暂离心，转移 400 $\mu$ l 消化液至 Nunc 96 孔板中。

4. [机器]加入 400µl Buffer BD 和 20µl MagPure Particle N 至样品中。1,000~1,400rpm 振荡混匀 5 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】。按第 7 步进行操作。

#### F. 唾液和湿拭子样品

1. 在 Nunc 96 孔深孔板中，每孔加入 20µl Proteinase K 和 20µl MagPure Particles N。
2. 转移 400µl 唾液或液体样品至深孔板中。
3. 贴上封口膜，1,000~1,400rpm 振荡混匀 3 分钟。室温~55°C 水浴 15~30 分钟。
4. 短暂离心收集管壁的液滴，撕去封口膜。
5. 加入 400µl Buffer BD 至样品中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 3 分钟。【调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试】
6. 按第 7 步进行操作。

#### 纯化步骤

7. 转移至 96 孔磁力架上吸附 10 分钟。吸弃溶液。
8. 加入 500µl Buffer BW1，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。
9. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。吸弃溶液。
10. (可选)重复第 8~9 步一次。[处理石蜡组织、干血片、组织样品可以省略这一步]
11. 加入 500µl 75%乙醇，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。
12. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。吸弃溶液。
13. 再加入 500µl 75%乙醇，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。
14. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。缓慢吸弃溶液，确保彻底吸弃残液。
15. 50°C 干燥 3-5 分钟去除乙醇。
16. 加入 50~100µl Elution Buffer，60°C 振荡（1,000rpm,）温育 3~10 分钟。
17. 转移至磁力架上吸附 3 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。



### 方案 3. KingFisher 类的提取流程

该方案适合于从抗凝血液、石蜡切片、干血片、培养细胞和组织样品中提取 DNA。由于不同的核酸提取仪设置和配件都有所不同，请根据平台进行调整，以下流程是根据 KingFisher Flex 而设计的。

#### 第一部分：样品板准备

##### A. 全血/血浆/血清/细胞重悬液(<10<sup>6</sup>)等

1. 在 2.2ml 深孔板中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. 转移 200 $\mu$ l 血液、血清、血浆、细胞重悬液或液体样品至装有裂解液的孔中。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品板中，选择 D6315\_Blood 进行操作。
4. 约 15 分钟，仪器暂停时，加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品孔中。
5. 其它按第二部分进行操作。

##### B. 动物组织(<10mg 动物组织)

1. 把<20mg 组织样品转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l Buffer ATL，55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30~120 分钟或直至样品完全消化。
3. (可选) 加入 10 $\mu$ l RNase A 至消化液中，室温放置 10-15 分钟。
4. (可选)13,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
5. 转移 200 $\mu$ l 消化液至 2.2ml 深孔板中。
6. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至深孔板，选择 D6315\_Blood 进行操作。
7. 约 15 分钟，仪器暂停时，加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品孔中。
8. 其它按第二部分进行操作。

##### C. 石蜡切片组织

1. 转移石蜡切片至 1.5ml 离心管中，用二甲苯或代替物(Buffer DPS)脱除石蜡。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer ATL 至样品中。55 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。90 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
3. (可选) 加入 10 $\mu$ l RNase A 至消化液中，室温放置 10-15 分钟。
4. (可选)13,000  $\times$  g 离心 3 分钟。

5. 转移 200 $\mu$ l 消化液至 2.2ml 深孔板中。
6. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至深孔板，选择 D6315\_Blood 进行操作。
7. 约 15 分钟，仪器暂停时，加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品孔中。
8. 其它按第二部分进行操作。

#### **D: 干血片 (FTA Card 或其它干血片)**

1. 用打孔器打出 3~5 个 3mm 直径的血片，转移至 2.0ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l Buffer ATL, 55 $^{\circ}$ C 振荡(>900rpm)温育 45-60 分钟。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL, 70 $^{\circ}$ C 振荡(>900rpm 温育 10~15 分钟。
4. 短暂离心收集管壁的液滴。
5. 转移 400 $\mu$ l 上清液和 400 $\mu$ l Buffer BD 至 2.2ml 深孔板中，选择 D6315\_Swab 进行操作。
6. 其它按第二部分进行操作。

#### **E. 拭子样品**

1. 转移拭子至 2ml 离心管中。
2. 加入 500 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15~30 分钟。
3. 短暂离心，转移 400 $\mu$ l 消化液至 2.2ml 深孔板中。
4. 加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品孔中，选择 D6315\_Swab 进行操作。
5. 其它按第二部分进行操作。

#### **F. 唾液或湿拭子样品**

1. 在深孔板中，每孔加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. **转移 400 $\mu$ l 含保存液的唾液样品或湿拭子浸泡液至深孔板中**，室温~55 $^{\circ}$ C 烘箱或水浴锅中温育 30~60 分钟。
3. 加入 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品孔中，选择 D6315\_Swab 进行操作。
4. 其它按第二部分进行操作。

**第二部分：**

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。[贴个封口膜，可以在室温放置 1 周]。

板的名称	板类型	试剂名称与用量
Elution	浅孔板	Elution Buffer B: 60~150µl (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 100~150µl)
Wash 3	深孔板	75% ethanol: 800µl
Wash 2	深孔板	Buffer BW1(已加乙醇): 500µl
Wash 1	深孔板	Buffer BW1(已加乙醇): 500µl MagPure Particles: 20µl Comb(磁力套)

2. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入程序对应的程序。
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 35~45 分钟后程序执行完毕。
5. 取出 DNA 样品，用封口膜封好。
6. 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
<b>DNA 有颜色</b>	
Proteinase K 与 Buffer AL 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。
<b>DNA 产量低</b>	
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 $\mu$ 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 N 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles N 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles N。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率