

M5 MagBead Blood DNA Kit (96 孔板法)

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 MagBead Blood DNA Kit	100T	MF048-01
M5 MagBead Blood DNA Kit	4x100T	MF048-02

【储存条件】

室温储存 12 个月不影响使用效果。本试剂盒所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时，Buffer ML 可能形成沉淀，可在 56°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。

【产品简介】

本试剂盒提供了一种简单、快速、高效的血液 DNA 提取方法，适用于从新鲜或冷冻抗凝血（柠檬酸盐、EDTA、肝素处理过的血液样品）中提取血液 DNA。在离液盐存在时，DNA 结合于硅基包被的 Magbeads 表面。经两步漂洗以及一步快速漂洗（MW3 的快速漂洗对于提高 DNA 纯度有很大帮助）后，高纯度的 DNA 被洗脱于 EB 或去离子水中。DNA 得率与样品的类型，储存条件、时间以及样品中白细胞的含量有很大关系。纯化得到的 DNA 纯度好（ $A_{260/280}$ 的比值在 1.7-1.9 之间， $A_{260/230}$ 的比值大于 1.5），完整度高（最高可达 50 kb），可用于克隆，定量 PCR，芯片测序等下游反应。该试剂盒可与液体工作站配套使用，简单、快速的进行大规模提取，大大降低了实验者的工作量和实验中的人为误差。

【产品组份】

	100T	400T	注意事项
Buffer ML	24 ml	96ml	室温密闭干燥保存
Buffer GW1	80 ml	4x80ml	室温密闭干燥保存
Buffer GW2	50 ml	4x50ml	室温密闭干燥保存
Buffer EB	30 ml	96ml	室温密闭干燥保存
Proteinase K	2x25mg	180mg	室温密闭干燥保存
Proteinase K Storage Buffer	2x1.25ml	2x5ml	室温密闭干燥保存
MagBeads	2x1ml	8ml	室温密闭干燥保存

【自备仪器、试剂】

- 手动单管提取：恒温混均仪，2/15 ml 磁力架，异丙醇和无水乙醇。
- 手动 96 孔深孔板提取：恒温混均仪、废液抽吸系统、手动连续分液器、电动连续分液器、手动连续分液器分液管、96 孔板磁力架，异丙醇和无水乙醇。
- 磁棒法磁珠自动提取系统：磁棒法磁珠自动提取系统、异丙醇和无水乙醇。

【准备及注意事项】

- 向 Proteinase K 中加入指定用量的 Proteinase K Storage Buffer 使其溶解（25mg 加入 1.25ml，180mg 加入 9ml），-20°C 保存。配置好的 Proteinase K 勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
- 异丙醇与 MagBeads 混合物的制备（以提取 10 个样品所需量为例）：
 - 向合适容量（加入异丙醇和 MagBeads 后总体积小于离心管容积的 2/3）的离心管中加入 3.3 ml 【 $0.3 \times (10+1) = 3.3$ 】的异丙醇。**注意：如用移液器加入异丙醇，需用移液器将枪头在异丙醇吸两次后再缓慢吸取异丙醇。**
 - 向上一步的离心管中加入 220 μ l 【 $20 \times (10+1) = 220$ 】MagBeads。**注意：MagBeads 加入前需涡旋振荡 20 秒使其充分混匀，异丙醇与 MagBeads 混合物使用前需涡旋振荡 20 秒使其成为均一的溶液。**
- MagBeads 严禁冰冻，离心，冰冻。离心可能会对 MagBeads 造成不可逆的损害。
- 样品避免反复冻融，否则会导致提取得到的 DNA 片段较小且提取得率低。
- 第一次使用前请按试剂瓶标签在 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇并做好标记。
- 如 Buffer ML 中出现沉淀，请在 56°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。
- 实验过程中，磁珠在溶液中的充分混匀对于提取的得率和纯度都有很大影响，务必使磁珠与溶液充分混匀。请注意实验过程中磁珠状态，如果出现磁珠贴壁等未充分混匀现象，请用移液器吹吸混匀或者调整震荡频率。

【操作步骤】（手动单管操作）

1. 向 1.5ml 离心管中加入 20 μ l Proteinase K， 然后加入 200 μ l 血液样品。**注意：**1) 冷冻抗凝血需提前在室温下放置，融化均匀；2) 如血液体积大于或小于 200 μ l， Proteinase K、Buffer ML 和异丙醇与磁珠混合物的用量按比例调整。
2. 向离心管中加入 200 μ l Buffer ML， 涡旋振荡 5 秒使其充分混匀后， 将离心管放于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 15 分钟， 期间涡旋振荡混匀 2 次。
3. 将离心管从水浴锅中取出， 短暂离心后室温放置 5 分钟。加入彻底混匀的 320 μ l 异丙醇与 MagBeads 混合物， 涡旋振荡混匀 5 秒钟后将离心管放于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 5 分钟或将离心管连续颠倒混匀 10 分钟。
4. 将离心管放于磁力架上静置 1 分钟， 待 MagBeads 完全吸附于离心管侧壁后彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
5. 将离心管从磁力架上取下， 加入 750 μ l Buffer GW1（使用前请检查是否已经加入无水乙醇）， 后涡旋振荡 1 分钟或涡旋振荡 5 秒后放于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 2 分钟（振荡过程中确保 MagBeads 处于混匀状态）。之后将离心管放于磁力架上静置 1 分钟， 待 MagBeads 完全吸附于离心管侧壁后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
6. 重复步骤 5。
7. 将离心管从磁力架上取下， 加入 750 μ l Buffer GW2（使用前请检查是否已经加入无水乙醇）， 后涡旋振荡 1 分钟或涡旋振荡 5 秒后放于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 2 分钟（振荡过程中确保 MagBeads 处于混匀状态）。之后将离心管放于磁力架上静置 1 分钟， 待 MagBeads 完全吸附于离心管侧壁后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
8. 重复步骤 7。
9. 保持离心管固定于磁力架上， 用移液器进一步去除离心管管底和管盖上的溶液， 放置室温 5-10 分钟， 挥发干净乙醇。**注意：**如果离心管侧壁有液珠， 可向离心管中加入 750 μ l 无水乙醇， 盖盖后颠倒离心管（保持离心管固定于磁力架）， 之后彻底弃去无水乙醇。
10. 将离心管从磁力架上取下， 加入 50-200 μ l Buffer EB， 涡旋振荡使磁珠完全悬浮于洗脱液中后将其放于 56 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡洗脱 10 分钟， 或将离心管放于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 10 分钟， 期间每隔 3 分钟涡旋振荡 10 秒钟。
11. 将离心管放于磁力架上静置 2 分钟， 待 MagBeads 完全吸附于离心管侧壁后用移液器将洗脱液转移至新的离心管中， -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

【操作步骤】（手动 96 孔深孔板操作）

1. 向 2ml 96 孔深孔板（简称 深孔板）中加入 20 μ l Proteinase K， 然后加入 200 μ l 血液样品， 并记录每孔中所加血液的名称。**注意：**1) 可将 Proteinase K 预先分装于 8 连管中， 每管加入 260 μ l。之后， 用 8 通道移液器将 Proteinase K 分装于 96 孔深孔板中；2) 血液需加到 96 孔深孔板的底部， 避免血液触碰到孔的上部。
2. 向深孔板中用电动连续分液器或 8 通道移液器加入 200 μ l Buffer ML。
3. 将深孔板固定于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 2 分钟， 盖上硅胶盖后将深孔板放于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 15 分钟， 之后再 将深孔板固定于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 5 分钟。
4. 将深孔板从恒温混匀仪上取下， 用电动连续分液器或 8 通道移液器向深孔板中加入彻底混匀的 320 μ l MagBeads 与异丙醇混合物， 盖上硅胶盖后， 立即将深孔板固定 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 5 分钟。
5. 将深孔板从恒温混匀仪上取下， 放于 96 孔板磁力架上静置 2 分钟， 用废液抽吸系统或 8 通道移液器弃去溶液， 期间避免接触磁珠。**注意：**用废液抽吸系统去除溶液时需将真空泵调节到较小的负压值， 使溶液以一个合适的速度被吸走， 速度过快会造成磁珠的丢失。
6. 用手动连续分液器向深孔板中加入 500 μ l Buffer GW1（加入前检查是否已加入无水乙醇）， 之后将深孔板固定于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 3 分钟。

7. 将深孔板从恒温混匀仪上取下后放于 96 孔板磁力架上静置 2 分钟。用废液抽吸系统或 8 通道移液器弃去溶液，期间避免接触磁珠。
8. 重复步骤 6-7。
9. 用手动连续分液器向深孔板中加入 500 μ l Buffer GW2（加入前检查是否已加入无水乙醇），之后将深孔板固定于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 3 分钟。
10. 将深孔板从恒温混匀仪上取下后放于 96 孔板磁力架上静置 2 分钟。用废液抽吸系统或 8 通道移液器弃去溶液，避免接触磁珠。
11. 重复步骤 9-10。
12. 用手动连续分液器向深孔板中加入 500 μ l 无水乙醇，之后将深孔板固定于 25 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 1 分钟。
13. 将深孔板从恒温混匀仪上取下后放于 96 孔板磁力架上静置 2 分钟。用废液抽吸系统或 8 通道移液器弃去溶液，避免接触磁珠。
14. 保持深孔板固定于 96 孔板磁力架上，将深孔板倒置于干净的吸水纸上放置 2 分钟。之后将深孔板从 96 孔板磁力架上取下放于 100 $^{\circ}$ C、1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 5 分钟。
15. 用电动连续分液器或 8 通道移液器向深孔板加入 100-200 μ l Buffer EB，将深孔板放于 100 $^{\circ}$ C（因该恒温混匀仪为悬空加热，洗脱液实际温度在 50-60 $^{\circ}$ C 之间），1600rpm 的恒温混匀仪上振荡混匀 10 分钟。
16. 将深孔板从恒温混匀仪上取下后放于 96 孔磁力架上静置 2 分钟，用 8 通道移液器溶液转移至 96 孔 PCR 板中，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

【操作步骤】（与 KingFisher Duo 匹配）

与 KingFisher Duo 匹配，可以从 12 份体积为 200 μ l 的不同血液中提取基因组 DNA。

1. 按下表将样品与试剂加入相应的位置：

名称	位置	试剂及用量
DW96 深孔板	A1-A12	Proteinase K: 20 μ l, Blood: 200 μ l, Buffer ML: 200 μ l
	B1-B12	KF Duo 12 道磁套
	C1-C12	Buffer GW1: 700 μ l
	D1-D12	Buffer GW1: 700 μ l
	E1-E12	Buffer GW2: 700 μ l
	F1-F12	Buffer GW2: 700 μ l
KF Duo 洗脱条	A1-A12	Buffer EB: 100 μ l

2. 启动软件 BindIt，导入 CoWin Magbind Blood DNA Duo-200 程序。将加入样本与试剂的 DW 96 深孔板与 KF Duo 洗脱条放入 KingFisher Duo 仪器中后执行程序 CoWin Magbind Blood DNA Duo-200。
3. 约 12 分钟后仪器暂停，取出 DW 96 深孔板，向 A1-A12 孔中加入 320 μ l 彻底混匀的 MagBeads 与异丙醇混合物。
4. 将 DW 96 深孔板重新放入仪器中，继续运行程序。约 26 分钟后程序运行结束。
5. 取出 96 深孔板与 KFDuo 洗脱条，将洗脱条中的 DNA 溶液转移至 1.5ml 离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

【操作步骤】（与 KingFisher Flex 匹配）

与 KingFisher Flex 匹配，可以从 96 份体积为 200 μ l 的不同血液中提取基因组 DNA。

1. 按下表将样品与试剂加入相应的位置：

类型	名称	试剂及用量
DW96 深孔板	Sample plate	Proteinase K: 20 μ l, Blood: 200 μ l, Buffer ML: 200 μ l
	Wash plate I	Buffer GW1: 700 μ l, KF 96 DW 磁套
	Wash plate II	Buffer GW1: 700 μ l
	Wash plate III	Buffer GW2: 700 μ l
	Wash plate IV	Buffer GW2: 700 μ l
	Elution plate	Buffer EB: 100 μ l

2. 启动软件 BindIt，导入 CoWin Magbind Blood DNA Flex-200 程序。将加入试剂的 DW 96 深孔板按顺序放入仪器中的相应位置后执行程序 CoWin Magbind Blood DNA Flex-200。
3. 约 14 分钟后仪器暂停，取出样品板，向样品板中加入 320 μ l 彻底混匀的 MagBeads 与异丙醇混合物。
4. 将样品板重新放入仪器中，继续运行程序。约 26 分钟后程序运行结束。
5. 取出洗脱板，用膜封闭后，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。