

M5 KingFisher Free-Circulating DNA Kit

KF 游离 DNA 提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 KingFisher Free-Circulating DNA Kit	100T	MF066-01
M5 KingFisher Free-Circulating DNA Kit	400T	MF066-04

【储存条件】

常温保存。

【试剂盒组分】

Component	100T	400T
Buffer KCL	96 ml	2×192 ml
Buffer KCW1 (concentrate)	72 ml	3×72 ml
Buffer KCW2 (concentrate)	60 ml	3×60 ml
Buffer EB	30 ml	96 ml
Proteinase K	2×25 mg	180 mg
Proteinase K Storage Buffer	2×1.25 ml	2×5 ml
Magbeads PN	4 ml	16 ml

【产品简介】

该试剂盒适合于从 300 μ l 样本如血浆、血清、羊水、淋巴液、尿液等无细胞体液中简单、高效的纯化回收游离 DNA (Free circulating/Cell-free DNA)。在高盐存在时，游离 DNA 结合于硅基包被的 Magbeads 表面。漂洗后，高纯度的游离 DNA 被洗脱于 Buffer EB 或去离子水中。游离 DNA 的得率与样品类型、储存条件、时间以及个体间差异有很大关系。纯化得到的游离 DNA 质量稳定、可靠，可用于定量 PCR 以及二代测序建库等下游实验。该试剂盒还可用于病毒 DNA 的提取。该试剂盒可与 KingFisher 自动磁珠提取系统、液体工作站配套使用，简单、快速的进行高通量提取，大大降低了实验者的工作量和实验中的人为误差。

【自备试剂】

1. KingFisher Duo 或 KingFisher Flex。
2. 恒温混匀仪。
3. 异丙醇、无水乙醇。

【实验前准备及注意事项】

1. 向 Proteinase K 加入的 **Proteinase K Storage Buffer** 使其溶解 (25mg 对应 1.25ml, 180mg 对应 9ml), -20°C 保存。配制好的 **Proteinase K** 勿长时间室温放置。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取率低。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在 Buffer KCW1 和 Buffer KCW2 中加入无水乙醇并做好标记。
4. Magbeads 严禁冰冻、离心。冰冻和离心可能会对 Magbeads 造成不可逆的损害。
5. Magbeads 在使用前一定要涡旋震荡 20 秒使其充分混匀。

【操作步骤】(手动)

第一次使用前请检查 Buffer KCW1 和 Buffer KCW2 中是否已加入无水乙醇。

1. 向 1.5ml 的离心管中加入 20 μ l Proteinase K，之后加入 300 μ l 血浆。
2. 向上一步的离心管中加入 300 μ l Buffer KCL，涡旋震荡 5 秒钟使其充分混匀后将离心管放于 56°C 水浴锅中孵育 10 分钟。
3. 将上一步的离心管从水浴锅中取出，短暂离心后室温放置 5 分钟。
4. 向上一步的离心管中加入 150 μ l 异丙醇，涡旋震荡混匀后短暂离心。之后向离心管中加入 40 μ l 彻底混匀的 Magbeads，涡旋震荡 5 秒钟后放于 25°C、1500 rpm 的恒温混匀仪上震荡 10 分钟（震荡过程中确保 Magbeads 处于悬浮状态）或连续颠倒混匀 10 分钟。

注意：如果样品量较多，可将异丙醇与 Magbeads 提前按比例混匀，之后同时加入裂解产物中。

5. 将上一步的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），期间避免接触 Magbeads。
6. 将离心管从磁力架上取下，加入 500 μ l Buffer KCL 后涡旋点震 20 秒或放于 25°C、1500 rpm 的恒温混匀仪上震荡 2 分钟（震荡过程中确保 Magbeads 处于悬浮状态）。之后将离心管固定于磁力架上静置 2 分钟，待 Magbeads 完全吸附于离心管侧壁后弃去溶液。

注意：如果样品为血清、羊水、淋巴液或尿液，Buffer KCL 漂洗步骤可去除。

7. 将离心管从磁力架上取下，加入 750 μ l Buffer KCW1 后涡旋点震 20 秒或放于 25°C、1500 rpm 的恒温混匀仪上震荡 2 分钟（震荡过程中确保 Magbeads 处于悬浮状态）。之后将离心管固定于磁力架上静置 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弃去溶液，期间避免接触 Magbeads。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 750 μ l Buffer KCW2 后涡旋点震 20 秒或放于 25°C、1500 rpm 的恒温混匀仪上震荡 2 分钟（震荡过程中确保 Magbeads 处于悬浮状态）。之后将离心管固定于磁力架上静置 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弃去溶液，期间避免接触 Magbeads。
9. 重复步骤 8。
10. 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，之后室温放置 5-10 分钟，使乙醇挥发干净。

注意：如果离心管壁上有液珠，可向离心管中加入 800 μ l 无水乙醇。盖盖后颠倒离心管，之后彻底去除无水乙醇。

11. 将离心管从磁力架上取下，加入 30-100 μ l Buffer EB 或去离子水。涡旋震荡时 Magbeads 完全悬浮于洗脱液中后将其放入 56°C、1500 rpm 的恒温混匀仪上震荡洗脱 10 分钟或放于 56°C 水浴锅中孵育 10 分钟，期间每隔 3 分钟涡旋震荡 10 秒钟。
12. 将上一步的离心管放置于磁力架上静置 2 分钟，待 Magbeads 完全吸附后用移液器将洗脱液转移至新的离心管中-20°C 保存备用。

【操作步骤】（与 KingFisher Duo 的匹配）

MF066 与 KingFisher Duo 匹配后 1 次可从 12 份体积为 300 μ l 的不同血浆样本中提取游离 DNA。

1. Buffer KLB 的制备：

- 1) 向 15 ml 离心管中加入 3.9 ml Buffer KCL；
- 2) 向上一步的离心管中加入 1.95 ml 的异丙醇；
- 3) 将 Buffer KCL 与异丙醇的混合物混匀后即得 5.85 ml Buffer KLB，可用于从 12 份体积为 300 μ l 的不同血浆中提取游离 DNA。

2. 按下表将样品与试剂加入相应位置：

名称	位置	试剂及用量
DW 96 深孔板	A1-A12	Proteinase K: 20 μ l Plasma: 300 μ l Buffer KLB: 450 μ l
	B1-B12	KF Duo 12 道磁套
	C1-C12	Buffer KCL: 500 μ l
	D1-D12	Buffer KCW1: 700 μ l Magbeads: 40 μ l
	E1-E12	Buffer KCW2: 700 μ l
	F1-F12	Buffer KCW2: 700 μ l
KF Duo 洗脱条	A1-A12	Buffer EB: 70 μ l

注意：Magbeads 加入 DW96 深孔板前需涡旋震荡使其彻底混匀。

- 启动软件 BindIt, 导入 CW2512-Duo 300 程序。将加入样本与试剂的 DW 96 深孔板、KF Duo 洗脱条和 KF Duo 12 道磁套放入 KingFisher Duo 仪器中后执行程序 CW2512-Duo 300。
- 约 40 分钟后程序执行完毕。取出 DW 96 深孔板与 KF Duo 洗脱条, 将洗脱条中的 DNA 溶液转移至 1.5 ml 离心管中, -20°C 保存。

【操作步骤】(与 KingFisher Flex 的匹配)

与 KingFisher Flex 匹配后 1 次可从 96 份体积为 300 μ l 的不同血浆样本中提取游离 DNA。

1. Buffer KLB 的制备:

- 向 100 ml 瓶中加入 30 ml Buffer KCL;
- 向上一歩的瓶中加入 15 ml 的异丙醇;
- 将 Buffer KCL 与异丙醇的混合物混匀后即得 45 ml Buffer KLB, 可用于从 96 份体积为 300 μ l 的不同血浆中提取游离 DNA。

2. 按下表将样品与试剂加入相应位置:

名称	类型	试剂及用量
Lysis plate I	DW 96 深孔板	Proteinase K: 20 μ l Plasma: 300 μ l Buffer KLB: 450 μ l
Wash plate I	DW 96 深孔板	Buffer KCL: 500 μ l KF 96 DW 磁套
Wash plate II	DW 96 深孔板	Buffer KCW1: 700 μ l Magbeads: 40 μ l
Wash plate III	DW 96 深孔板	Buffer KCW2: 700 μ l
Wash plate IV	DW 96 深孔板	Buffer KCW2: 700 μ l
Elution plate	DW 96 深孔板	Buffer EB: 70 μ l

注意：Magbeads 加入 DW96 深孔板前需涡旋震荡使其彻底混匀。

- 启动软件 BindIt, 导入 CW2512-Flex 300 程序。将加入样本与试剂的 DW 96 深孔板、KF96 DW 磁套放入 KingFisher Flex 仪器中后执行程序 CW2512-Flex 300。
- 约 40 分钟后程序执行完毕。取出 DW 96 深孔板, 将 Elution plate 中的洗脱液转移至 96 孔 PCR 板中, 用硅胶盖封闭后 -20°C 保存。

【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。