

## 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 DNA 手工单管式操作方案	5
方案 2: 组织/细胞 DNA 手工 96 孔板操作方案	7
方案 3: 组织/细胞 DNA 的移液工作站方案	9
常见问题回答	11

版本: 2017-09

## 简介

MagPure Tissue DNA LQ Kit 为动物组织和培养细胞等生物样品 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，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自动化移液平台和手工提取而设计的。

MagPure Tissue 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。

## 组 成

### MagPure Tissue DNA LQ Kit

产品编号	D6321-01	D6321-02	D6321-03
纯化次数	48 次	96 次	5 x 96 次
MagPure Particles	1.2 ml	2.4 ml	11 ml
Buffer ATL	30 ml	60 ml	250 ml
Buffer AL	15 ml	30 ml	120 ml
Buffer BD*	6 ml	15 ml	50 ml
Proteinase K	24 mg	48 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	3 ml	5 ml	30 ml
RNase A	10 mg	20 mg	90 mg
Buffer BW1 *	44 ml	66 ml	3 x 110 ml
Elution Buffer	15 ml	30 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

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

## 方案 1. 组织/细胞 DNA 手工单管式操作

该方案适合于从 2~30mg 动物组织或小于  $5 \times 10^6$  培养细胞等样品中提取 DNA。

### 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。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。
- 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 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。
- 单管式磁力架[手工单管]或 96 孔磁力架, MG96-1 [手工高通量]

### A: 动物组织

1. 称取 2-20mg 动物组织(或<10mg 肝脏、肺或脾脏), 并处理成尽量小的碎片, 转移至 1.5ml 离心管中。**加入 180 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 涡旋混匀。55℃ 振荡消化 30~180 分钟或直至样品完全消化。**
2. **加入 10 $\mu$ l RNase A 至消化液中混匀, 室温放置 10 分钟降解 RNA。**
3. **加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至样品中, 涡旋混匀 10 秒。70℃ 温育 10 分钟(可选)。按第 4 步进行操作。**

### B: 培养细胞(< $5 \times 10^6$ )

1. 计算细胞数量, 300 x g 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液, 余下 100 $\mu$ l 残液和细胞沉淀, 涡旋重悬细胞。
2. **加入 100 $\mu$ l Buffer ATL、20 $\mu$ l Proteinase K 和 10 $\mu$ l RNase A 至样品中。涡旋 5 秒, 室温静置 10 分钟。**
3. **加入 200 $\mu$ l Buffer AL 至细胞重悬液中。涡旋混匀 10 秒。65℃ 温育 15~30 分钟, 按第 4 步进行操作。**

### C: 保存的唾液样品

1. 在 1.5ml 离心管中, 加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. 转移 400 $\mu$ l 唾液样品(含保存液)至装有蛋白酶 K/磁珠的离心管中, 振荡混匀 5 秒。

3. 65°C 振荡温育 30 分钟。按第 4 步进行操作。

#### **D: 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 5 次，高速涡旋混匀 10 秒。70°C 水浴或振荡温育 10 分钟。按第 4 步进行操作。

#### **E: 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 3~5 个 3mm 直径的血片，并转移 1.5ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 300 $\mu$ l Buffer ATL，55°C 振荡(900rpm)温育 60 分钟。
3. 加入 100 $\mu$ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀，70°C 振荡(900rpm)温育 15 分钟。短暂离心，转移所有的消化液至新的 1.5ml 离心管中。按第 4 步进行操作。

#### **F: 含保存液的拭子**

1. 取拭子保存管，10,000 x g 离心 2 分钟，吸弃多余的保存液，余下 250 $\mu$ l 保存液和拭子。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 150 $\mu$ l Buffer ATL，55~65°C 振荡(900rpm)温育 15~30 分钟。
3. 短暂离心，转移所有的消化液至新的 1.5ml 离心管中。按第 4 步进行操作。

#### **G: 干拭子**

1. 取一个干拭子至 2.0ml 离心管中。
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 500~600 $\mu$ l Buffer ATL，55~65°C 振荡(900rpm)温育 15~30 分钟。
3. 短暂离心，转移 400~450 $\mu$ l 消化液至新的 1.5ml 离心管中。按第 4 步进行操作。

#### **纯化步骤**

4. **加入 20 $\mu$ l MagPure Particles 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。**颠倒混匀 30~50 次。转移至磁力架上吸附 2 分钟。倒弃或吸弃溶液。
5. **加入 500 $\mu$ l Buffer BW1，涡旋 10 秒重悬磁珠。**转移至磁力架上吸附 1 分钟。倒弃或吸弃溶液。
6. 重复第 5 步一次。

7. **加入 500 $\mu$ l 70%乙醇，涡旋 10 秒重悬磁珠。**转移至磁力架上吸附 1 分钟。倒弃或吸弃溶液。
8. 重复第 7 步一次。
9. 短暂离心收集管壁上的液滴，转移至磁力架上，吸尽残液。空气干燥 10 分钟。
10. **加入 30~100 $\mu$ l Elution Buffer，**涡旋打散磁珠。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。若无振荡温匀，其间涡旋混匀 2~3 次加速 DNA 的溶解。转移至磁力架上吸附 2 分钟，把 DNA 转移至新的离心管中。

## 方案 2. 组织/细胞 DNA 手工高通量提取

该方案适合于从 96 个 2~30mg 动物组织或培养细胞等样品中提取 DNA。

### 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。Proteinase K 干粉在 2-8 $^{\circ}$ C 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 -20 $^{\circ}$ C。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 分钟让磁珠充分分散。
  - Nunc U96 DeepWell Plate(Cat.No. 260251) [高通量]
  - 96 孔振荡仪, 如 IKA MS3 Vortex, Eppendorf MixMate[手工高通量]
1. 按方案 1 的步骤处理样品, 转移 400 $\mu$ l 消化液至 2.2ml 深孔板中。
  2. **加入 20 $\mu$ l MagPure Particles 和 400 $\mu$ l Buffer BD 至样品中。**1,000~1,200rpm 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】
  3. **转移至 96 孔磁力架上吸附 3 分钟。**将磁力架和 96 孔板扣在一起, 反转 180 度倒弃废液, 然后反扣于一叠吸水纸 2 分钟吸尽残液。【在反转倒废液时, 让磁力架

和 96 孔板紧扣一起不要松动，以防止磁珠的丢失，废液倒完后，反扣于吸水纸上吸尽孔口的残液，不要让溶液回流到孔中】

4. 加入 500 $\mu$ l Buffer BW1 至孔中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。
5. 转移至磁力架上吸附 2 分钟。将磁力架和 96 孔板扣在一起，反转 180 度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸 2 分钟吸尽残液。
6. 重复第 4~5 步一次。
7. 加入 500 $\mu$ l 70%乙醇。1,000~1,200rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。
8. 转移至磁力架上吸附 2 分钟。将磁力架和 96 孔板扣在一起，反转 180 度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸 1 分钟吸尽残液。
9. 重复第 7~8 步一次。让磁力架和 96 孔板反扣于吸水纸 5 分钟彻底吸弃残液。
10. 37 $^{\circ}$ C 干燥 15 分钟。
11. 加入 50~150 $\mu$ l 预热至 70 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer，1,200rpm 振荡混匀 10~15 分钟。
12. 转移至磁力架上吸附 3 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。

## 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	原因及解决方法
<b>DNA 纯度低</b>	
样品消化不充分	用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
样品用量太多	减少样品用量。富含核酸的样品如肝脏，脾脏，肺脏等样品，组织用量不要超过 10mg。
需要离心去除不消化物质	若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 $\times$ g 离心 5 分钟去除未消化的物质。

Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。Proteinase K 与 Buffer DL 不能预先混合。
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------

### DNA 产量低

样品 DNA 含量低	组织样品本身含量低，用富含核酸的肝脏，脾脏来提取
样品消化不充分	用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
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，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。

### RNA 污染

延长 RNASE 消化时间	动物的内脏如肝脏和肾脏，以及培养细胞富含 RNA，延长 RNase 消化时间至 60 分钟。
---------------	------------------------------------------------

### OD260/OD280 比值不正常

RNA 污染	加入 RNASE 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于 -20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
加入 Buffer AL 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
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。