

版本号: DP150128

Magnetic Blood Genomic DNA Kit

磁珠法血液基因组DNA提取试剂盒

目录号: DP329

产品内容

产品组成	DP329-01 (50 preps)	DP329-02 (200 preps)
裂解液GHL (Buffer GHL)	20 ml	80 ml
缓冲液GDA (Buffer GDA)	25 ml	90 ml
漂洗液PWD (Buffer PWD)	20 ml	2 × 40 ml
Proteinase K	1 ml	4 × 1 ml
磁珠悬浮液G (MagAttract Suspension G)	1 ml	4 × 1 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml	30 ml

储存条件

该试剂盒置于室温（15-25℃）干燥条件下，可保存12个月，更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在37℃水浴中孵育10 min，以溶解沉淀。

产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，从100 μ l-1 ml血液中分离纯化高质量基因组DNA。独特包埋的磁珠，在一定条件下对核酸具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的核酸，能够达到快速分离纯化核酸的目的。整个过程不涉及有机试剂，安全、便捷，提取的基因组DNA片段大，纯度高，质量稳定可靠，尤其适合高通量工作站的自动化提取。

使用本试剂盒纯化的DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、荧光定量PCR、文库构建、Southern杂交，芯片检测、高通量测序等实验。

产品特点

简便快捷：1 h内即可获得超纯的基因组DNA。

高通量：可整合移液法自动化仪器和磁棒法自动化仪器进行高通量提取实验

安全无毒：无需酚/氯仿等有机试剂

纯度高：获得的DNA纯度高，可直接用于芯片检测、高通量测序等实验。

提取得率

样本	提取量(μ l)	DNA得率(μ g)
新鲜血液	100-250	4-8
	250-1000	8-25
脐带血	100-250	4-10
陈旧血液	100-250	3-6

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 本产品适用于手工提取或自动化仪器整合。
2. 自备试剂：异丙醇，乙醇
3. 最适上样量：建议血液上样量为100-250 μ l最佳，如果要从250 μ l-1 ml的血液中提取基因组，需自备细胞裂解液CL（TIANGEN, RK151）和缓冲液GS（TIANGEN, RK152）。
4. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量也下降。
5. 若裂解液GHL中有沉淀，可在37 $^{\circ}$ C水浴中重新溶解，摇匀后使用。

操作步骤

使用前请先在缓冲液GDA和漂洗液PWD中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶子上的标签。

一、手工操作步骤：

1. 取200 μl 血液样品至2 ml离心管（自备）中。

注意：本试剂盒可从100 μl -1 ml血液中分离纯化高质量基因组DNA。

当血液样品处理量为100-250 μl 时：按下表加入裂解液和异丙醇用量。

血液起始量	裂解液用量	异丙醇用量
100 μl	150 μl	200 μl
150 μl	250 μl	320 μl
200 μl	300 μl	350 μl
250 μl	300 μl	350 μl

当血液样品处理量为250 μl -1 ml时：需细胞裂解液CL(TIANGEN, RK151) (自备) 处理，具体步骤如下：在样品中加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL，颠倒混匀，10,000 rpm (~11,500 \times g)离心1 min，吸去上清，留下细胞核沉淀(如果裂解不彻底，可加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL重复裂解一次)，向细胞核沉淀中加50 μl 缓冲液GS(TIANGEN, RK152) (自备)，振荡至彻底混匀，再进行下一步实验。

2. 加入20 μl Proteinase K溶液。
3. 加入300 μl 裂解液GHL，振荡混匀。

注意：当样本数目比较大时，可以按每300 μl 裂解液GHL加入20 μl Proteinase K的比例预先混合，混合后每个样本用量为320 μl ，混合后的溶液室温放置不要超过1 h，最好现用现配。

4. 将离心管置于65 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育15 min，期间颠倒混匀3回，每回3-5次。
5. 室温放置5 min。
6. 加入350 μl 异丙醇，振荡混匀10 sec。
7. 加入20 μl 磁珠悬浮液G，振荡混匀1 min，共静置9 min，每3 min振荡混匀1 min。

注意：为了确保磁珠彻底重悬，请在使用前振荡混匀。

-
8. 将离心管放置于磁力架上静置30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
 9. 将离心管从磁力架上取下, 加入700 μ l缓冲液GDA (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 振荡混匀5 min。
 10. 将离心管放置于磁力架上静置30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
注意: 如果对于DNA纯度要求更高, 可以重复步骤9和10一次。
 11. 将离心管从磁力架上取下, 加入700 μ l漂洗液PWD (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 振荡混匀2 min。
 12. 将离心管放置于磁力架上静置30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
 13. 重复步骤11和12一次。
 14. 将离心管于磁力架上, 室温晾干10-15 min。
注意: 乙醇残留会抑制后续的酶反应, 所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间, 以免难以洗脱DNA。
 15. 将离心管从磁力架上取下, 加入50-100 μ l洗脱缓冲液TB, 振荡混匀, 置于56 $^{\circ}$ C, 孵育10 min, 期间颠倒混匀3回, 每回3-5次。
 16. 将离心管放置于磁力架上静置2 min, 磁珠完全吸附后, 小心将DNA溶液转移至一个新离心管中, 并于适当条件保存。

二、移液法自动化仪器提取步骤

准备工作及注意事项:

1. 本产品可整合Hamilton Microlab STAR、Beckman Coulter Biomek[®] FX和Capitalbio LabKeeper等移液法自动化仪器进行高通量血液基因组提取工作。
2. 裂解液和Proteinase K混合液的配制: 按照300 μl 裂解液GHL加入20 μl Proteinase K的比例预先混合, 混合后每个样本用量为320 μl 。混合后的溶液室温放置不要超过一个小时, 最好现用现配。
3. 磁珠稀释液的配制: 按照20 μl 磁珠悬浮液G加入80 μl 异丙醇的比例混合, 混合后每个样本用量为100 μl 。
4. 对于Hamilton Microlab STAR类的仪器, 有放置2 ml离心管的板位, 可以不使用异丙醇来稀释磁珠, 异丙醇的加入体积仍为350 μl 。每个离心管可以放入1 ml左右的磁珠, 吸取磁珠前吹打混匀5次, 直接进行20 μl 磁珠的分液操作, 分液完成后将磁珠管盖盖好保存。
5. 对于DNA含量高的脐带血或者是经过细胞裂解液CL处理后的较大体积的起始血样, 建议血液裂解后加入异丙醇吹打混匀5次以后, 再加入磁珠进行混匀, 避免磁珠聚集后不易进行充分的漂洗。
6. 考虑仪器设定温度和96孔板内的实际温度有一定的偏差, 在裂解和洗脱时建议仪器设定温度比实际使用温度高出10 $^{\circ}\text{C}$ 。
7. 如果超出仪器吸取废液时的最大体积, 可以适当降低裂解液体积至250 μl 。

提取步骤:

1. 在96深孔板(自备)中加入200 μl 血液样本(若为冻存血, 请待完全解冻后再进行)。
2. 每孔加入320 μl 裂解液GHL和Proteinase K的混合液。
3. 将深孔板置于75 $^{\circ}\text{C}$, 孵育15 min, 一直振荡混匀。
4. 将加热模块温度调至25 $^{\circ}\text{C}$, 继续振荡5 min。
5. 每孔加入270 μl 的异丙醇, 吹吸6次, 然后振荡混匀5 min。
6. 每孔加入100 μl 磁珠稀释液, 吹吸6次, 然后振荡混匀10 min。
7. 将深孔板放置于磁力架上静置2 min, 磁珠完全吸附后, 吸去液体。

-
8. 将深孔板从磁力架上取下，加入100 μ l缓冲液GDA，振荡混匀2 min。然后再加入600 μ l缓冲液GDA，吹吸6次，然后振荡混匀2 min。
 9. 将深孔板放置于磁力架上静置2 min，磁珠完全吸附后，吸去液体。
注意：如果对于DNA纯度要求更高，可以重复步骤8和9一次。
 10. 将深孔板从磁力架上取下，加入100 μ l漂洗液PWD，振荡混匀1 min。然后加入600 μ l漂洗液PWD，吹吸6次，然后振荡混匀2 min。
 11. 将深孔板放置于磁力架上静置2 min，磁珠完全吸附后，吸去液体。
 12. 重复步骤10和11一次。
 13. 将深孔板置于磁力架上，37 $^{\circ}$ C晾干5 min。
 14. 将深孔板从磁力架上取下，加入50-100 μ l洗脱缓冲液TB，置于65 $^{\circ}$ C，振荡混匀10 min。
 15. 将深孔板放置于磁力架上静置2 min，磁珠完全吸附后，小心将DNA溶液转移至收集板中，并于适当条件保存。

三、磁棒法自动化仪器提取步骤：

准备工作及注意事项：

1. 本产品既可整合 Thermo KingFisher Flex 等有加热装置的磁棒法自动化仪器进行高通量血液基因组提取工作，也适用于 Taco 等没有加热装置的磁棒法自动化仪器。
2. 裂解液和 Proteinase K 混合液的配制：按照 300 μl 裂解液 GHL 加入 20 μl Proteinase K 的比例预先混合，混合后每个样本用量为 320 μl 。混合后的溶液室温放置不要超过 1 h，最好现用现配。
3. 将 700 μl 缓冲液 GDA、700 μl 漂洗液 PWD 和 50-100 μl 洗脱缓冲液 TB 分别加到 96 孔板相应的位置上，将 20 μl 磁珠 G 加入到 700 μl 缓冲液 GDA 中。
4. 使用磁棒法仪器也可以按照移液法仪器的操作步骤，需要裂解步骤完成后，设置暂停步骤再加入异丙醇。

提取步骤：

1. 在 96 深孔板（自备）中加入 200 μl 血液样本（若为冻存血，请待完全解冻后再进行）。
2. 每孔加入 320 μl 裂解液 GHL 和 Proteinase K 混合液。
3. 将 96 孔板置于自动化提取仪中，75 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，期间中速和快速间隔拍打混匀。
4. 仪器暂停后，每孔加入 350 μl 异丙醇，快速拍打混匀 5 min。
5. 使用磁力套深入到含有磁珠的缓冲液 GDA 的孔中，快速拍打混匀 1 min，吹散磁珠。
6. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
7. 将磁珠转移到含有血液和裂解液 GHL 的孔中，释放磁珠，中速和快速间隔拍打混匀 10 min。
8. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
9. 将磁珠转移到含有第一遍缓冲液 GDA 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。
10. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
11. 将磁珠转移到含有第二遍缓冲液 GDA 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。
12. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。

-
13. 将磁珠转移到含有第一遍漂洗液PWD的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀3 min。
 14. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠3次，每次20 sec。
 15. 将磁珠转移到含有第二遍漂洗液PWD的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀3 min。
 16. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠3次，每次20 sec。
 17. 磁力棒吸附磁珠后悬空晾干 5 min。
 18. 将磁珠转移到含有洗脱缓冲液TB的孔中，75°C 孵育，快速拍打混匀10 min。
 19. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠3次，每次30 sec。
 20. 将吸附的废弃磁珠转移到含有漂洗液PWD的孔中，拍打混匀1 min。
 21. 程序结束后，小心将DNA溶液转移至收集板，并于适当条件保存。

DNA浓度及纯度检测

得到的基因组DNA片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的DNA片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。

DNA应在OD₂₆₀处有显著吸收峰，OD₂₆₀值为1相当于大约50 µg/ml双链DNA、40 µg/ml单链DNA。

OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应为1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。