



Magbead Blood DNA Kit

磁珠法血液DNA提取试剂盒

目录号：CW2361S (96 preps)
CW2361M (4×96 preps)

保存条件：室温（15-30℃）

产品内容

Component	CW2361S 96 preps	CW2361M 4×96 preps
Buffer ML	24 mL	96 mL
Buffer GW1(concentrate)	80 mL	4×80 mL
Buffer GW2(concentrate)	50 mL	4×50 mL
Buffer EB	30 mL	96 mL
Proteinase K	2×1.25 mL	2×5 mL
Magbeads PN	2×1 mL	8 mL

产品简介

该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。在高盐存在时，DNA结合于硅基包被的Magbeads表面。漂洗后，高纯度的DNA被洗脱于Buffer 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，从200 μ L 冷冻保存的抗凝血中通常可以提取得到3-10 μ g基因组DNA。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），可用于二代测序、克隆、定量PCR、芯片检测等下游实验。

该试剂盒可与液体工作站和磁棒法磁珠自动提取系统配套使用，简单、快速地进行大规模提取，大大降低了实验者的工作量和实验中的人为误差。

自备仪器、试剂

1. 手动单管提取：

- 1) 恒温混匀仪——货号：CW2593
- 2) 2/15 mL磁力架——货号：CW2594
- 3) 异丙醇、无水乙醇

2. 手动96孔深孔板提取：

- 1) 恒温混匀仪——货号：CW2593
- 2) 废液抽吸系统——货号：CW2616
- 3) 手动连续分液器——推荐品牌Eppendorf
- 4) 电动连续分液器——推荐品牌Eppendorf
- 5) 手动连续分液器分液管（25 mL）——推荐品牌Eppendorf
- 6) 96孔板磁力架——货号：CW2595
- 7) 异丙醇、无水乙醇

3. 磁棒法磁珠自动提取系统：

- 1) 磁棒法磁珠自动提取系统——建议品牌Thermo Fisher
- 2) 异丙醇、无水乙醇

实验前准备及重要注意事项

1. 异丙醇与Magbeads混合物的制备（以制备提取10个样品所需量为例）
 - 1) 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吹吸两次后再缓慢吸取异丙醇。
 - 2) 向上一部的离心管中加入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秒钟使其成为均一的溶液。
 - 3) 异丙醇与Magbeads混合物使用前需涡旋振荡10秒钟使其成为均一的溶液。
2. Magbeads严禁冰冻、离心。冰冻、离心可能会对Magbeads造成不可逆的损害。
3. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取得到的DNA片段较小且提取得率低。
4. 次使用前应按试剂瓶标签在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇并做好标记。
5. 如Buffer ML中出现沉淀，请在56℃水浴锅中重新溶解，摇匀后即可使用。
6. 实验过程中，磁珠在溶液中的充分混匀对于提取的得率与纯度都有很大的影响。实验过程中务必使磁珠与溶液充分混匀。不同厂家生产的恒温混匀仪震荡混匀效果有一定差异，实验过程中请注意观察磁珠状态。如出现磁珠贴壁等未充分混匀的现象，请用移液器吹吸混匀或调整震荡频率。

操作步骤（手动单管操作）

1. 向1.5 mL的离心管中加入20 μ L Proteinase K，之后加入200 μ L的血液。
注意：1) 冷冻抗凝血液需提前在室温（15-30℃）下放置，融化混匀。
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需按比例调整。
2. 向离心管中加入200 μ L Buffer ML，涡旋振荡5秒钟使其充分混匀后，将离心管放于56℃水浴锅中孵育15分钟，期间涡旋震荡混匀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，涡旋震荡混匀5秒钟后将离心管放于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀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 μL Buffer GW1（使用前请检查是否已加入无水乙醇）后涡旋点震1分钟或涡旋振荡5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震荡过程中确保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 μL Buffer GW2（使用前请检查是否已加入无水乙醇）后涡旋点震1分钟或涡旋振荡5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震荡过程中确保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，之后室温放置5-10分钟，使乙醇挥发干净。
注意：如果离心管侧壁上有液珠，可向离心管中加入750 μL 无水乙醇。盖盖后颠倒离心管（保持离心管固定于磁力架上），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 μL Buffer EB。涡旋震荡使磁珠完全悬浮于洗脱液中后将其放于56 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟，或将离心管放于56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育10分钟，期间每隔3分钟涡旋震荡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 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

操作步骤（手动96孔深孔板操作）

1. 向2 mL 96孔深孔板（简称“深孔板”）中加入20 μL Proteinase K，之后加入200 μL 血液，并记录每孔中所加血液名称。
注意：1) 可将Proteinase K预先分装于8连管中，每管加入260 μL 。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 μL Buffer ML。

3. 将深孔板固定于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟，盖上硅胶盖后将深孔板放于56℃水浴锅中孵育15分钟，之后再深孔板固定于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀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 μL Magbeads与异丙醇混合物。盖上硅胶盖后，立即将深孔板固定于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀5分钟。
5. 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，期间避免枪头接触磁珠。
注意：用废液抽吸系统去除溶液时需将真空泵调节至较小的负压值，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 μL 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℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀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，期间避免枪头接触磁珠。
8. 重复步骤6-7。
9. 用手动连续分液器向深孔板中加入500 μL 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℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀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，期间避免枪头接触磁珠。
11. 重复步骤9-10。
12. 用手动连续分液器向96孔深孔板中加入500 μL无水乙醇，之后将深孔板固定于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀1分钟。
13. 将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，期间避免枪头接触磁珠。
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℃、1600 rpm的恒温混匀仪上静置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 μL Buffer EB，之后将深孔板放于100℃（因该恒温混匀仪为悬空加热，洗脱液实际温度在50-60℃之间）、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀10分钟。
16. 将深孔板从恒温混匀仪上取下后放于96孔板磁力架上静置2分钟，用8通道移液器溶液转移至96孔PCR板中盖盖后-20℃保存备用。

操作步骤 (CW2361与KingFisher Duo的匹配)

CW2361与KingFisher Duo匹配后可从12份体积为200 μL 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位置:

名称	位置	试剂及用量
DW 96深孔板	A1-A12	Proteinase K: 20 μL Blood: 200 μL Buffer ML: 200 μL
	B1-B12	KF Duo 12道磁套
	C1-C12	Buffer GW1: 700 μL
	D1-D12	Buffer GW1: 700 μL
	E1-E12	Buffer GW2: 700 μL
	F1-F12	Buffer GW2: 700 μL
KF Duo洗脱条	A1-A12	Buffer EB: 100 μL

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 μL 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。

CW2361与KingFisher Flex匹配后可从96份体积为200 μ L的不同血液中提取血液基因组DNA。

1. 按下表将样品与试剂加入相应板中：

名称	类型	试剂及用量
Sample plate	DW 96深孔板	Proteinase K: 20 μ L Blood: 200 μ L Buffer ML: 200 μ L
Wash plate I	DW 96深孔板	Buffer GW1: 700 μ L KF 96 DW磁套
Wash plate II	DW 96深孔板	Buffer GW1: 700 μ L
Wash plate III	DW 96深孔板	Buffer GW2: 700 μ L
Wash plate IV	DW 96深孔板	Buffer GW2: 700 μ L
Elution plate	DW 96深孔板	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CoWin Magbind Blood DNA Flex-200程序。
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，继续执行程序。约26分钟后程序执行完成。
5. 取出洗脱板，用膜封闭后-20 $^{\circ}$ C保存。