

血液基因组 DNA 提取试剂盒（磁珠法）

货号：MBD02A

【概述】

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和缓冲液系统，从样品中分离纯化高质量基因组 DNA，特殊包被的磁珠，在一定条件下对目的 DNA 具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的 DNA，能够达到快速分离纯化 DNA 的目的。整个过程不涉及有毒试剂，安全、便捷、提取的 DNA 纯度高。使用本试剂盒纯化的基因组 DNA 均在 1.7-2.0 之间，可以应用到各类下游分子生物学实验。

【适用范围】

本试剂盒适合从新鲜或加入各种抗凝剂的血液中提取基因组 DNA。

【试剂盒包装及组成】

试剂盒组成	规格		
	10T	50T	100T
裂解液 B01	22 mL×1	110 mL×1	220 mL×1
裂解液 B02	2.2 mL×1	11 mL×1	22 mL×1
蛋白酶 K (20 mg/mL)	0.11 mL×1	0.55 mL×1	1.1 mL×1
磁珠	0.55 mL×1	1.4 mL×2	5.6 mL×1
漂洗液	/	1 (空瓶)	1 (空瓶)
洗脱液	1.5 mL×1	7.5 mL×1	15 mL×1
使用说明书	1 份	1 份	1 份
磁铁	1 块	/	/

【储存条件】

- 磁珠可以在室温下 (15-25℃) 运输，但请置于 2-8℃ 保存。
- 蛋白酶 K 需 -20℃ 保存，以保证其活性。
- 其余试剂室温保存，有效期 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℃ 水浴中预热 10 min 溶解沉淀，摇匀后使用。

【注意事项】

- 尽量使用新鲜的血液样品。
- 整个裂解过程操作尽量温和，并在要求时间内完成。
- 客户自备材料：异丙醇、无水乙醇、离心管、水浴锅、离心机（最大离心力 ≥ 12000 rpm/min ($\sim 10010\times g$)）。
- 请于本实验开始前穿上实验服、佩戴手套及口罩，避免实验操作过程中试剂沾染皮肤、眼睛等，并防止吸入口鼻。如不慎发生以上情况，请立即用清水冲洗，必要时请及时就医。
- 使用前请预先在漂洗液瓶或离心管中配制 70% 乙醇，并提前将水浴锅调至 65°C 备用。
- 磁珠在使用前一定要充分混匀。磁珠加入后，请尽量减少用枪头吹打混匀，防止磁珠沾在枪头上，造成基因组 DNA 损失。

【操作步骤】

1. 取 200 μL 血液于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 裂解液 B01，颠倒混匀，12000 r/min ($\sim 10010\times g$) 离心 1 min，弃上清。

- 加入裂解液 B01 后，请充分混匀，使细胞完全散开，悬浮于裂解液 B01 中，溶液呈红色透明状。
- 离心结束后，管底可见少量白色细胞沉淀，吸取上清时请勿触及沉淀或管底，以免样品损失。

2. 重复步骤 1 一次。

- 请充分混匀细胞沉淀，否则可能导致细胞裂解不彻底。
- 吸取上清时请勿触及沉淀或管底，以免样品损失。
- 请尽量吸净管底及管盖上的残液，以免影响 DNA 的纯度及 DNA 溶液的颜色。
- 此步骤结束后，管底沉淀应呈白色，如沉淀中有红色，说明细胞裂解不彻底，可再次重复本步骤，否则将可能降低 DNA 的纯度。

3. 向离心管中加入 200 μL 裂解液 B02、10 μL 蛋白酶 K，振荡混匀，将离心管置于 65°C ，水浴 10 min，期间混匀数次。

- 请充分混匀（可采用吹打或涡旋振荡的方式，后续步骤中不建议再采用涡旋混匀的方式，并注意操作尽量温和，以防止基因组 DNA 断裂。），使细胞完全散开，溶液中应无团块或絮状物，呈透明状。
- 裂解结束后，溶液应变透亮，如溶液未彻底变透亮，可适当延长裂解时间，否则将可能降低 DNA 的得率或导致提取的 DNA 不纯。

4. 室温放置 2 min，加入 220 μL 异丙醇，颠倒混匀 10 sec，再向离心管中加入 50 μL 磁珠，振荡混匀 1 min，室温静置 3 min，期间颠倒混匀 2 次。

- 加入异丙醇混匀后，可能会出现絮状沉淀。
- 向离心管中加入磁珠之前，请确保磁珠彻底重悬，可在使用前振荡混匀。
- 请确保磁珠在结合过程中呈悬浮状态。如磁珠加入后呈团状、丝状或颗粒状，可适当增加振荡力度及次数。

5. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，吸弃废液，从磁力架或磁铁上取下离心管。

- 若离心管管口及管壁上沾有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管，可参考如下步骤：将离心管置于磁力架上，

待磁珠完全吸附于管壁后，上下颠倒磁力架，使沾在管口的磁珠重悬至溶液中，避免磁珠损失。

- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 从磁力架或磁铁上取下离心管后，若离心管中仍有废液，可再次磁分离，吸弃废液。
- 本公司有多功能磁力架 (Mag0103)，无需使用移液器吸净废液，直接倾斜磁力架将废液倒出即可，可根据需要购买。

6. 向离心管中加入 600 μ L 70% 乙醇 (使用前请预先配制)，轻柔混匀 1-2 min，将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，吸弃废液。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。

7. 重复步骤 6 一次。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm ($\sim 6953 \times g$) 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。

8. 室温开盖晾干 5-10 min (可将离心管开盖置于超净工作台风口或吹风机冷风口)，至乙醇完全挥发 (侧面观察磁珠无反光；反面观察磁珠颜色由棕黑色变为深褐色，边缘龟裂；无液体挂壁)。

- 室温晾干前，请先尽量吸净残液。乙醇残留会抑制后续的酶反应 (如酶切、PCR 等) 实验，应确保乙醇完全挥发后再进行下一步操作。但也不能干燥太久 (磁珠不能完全龟裂)，以免 DNA 难以洗脱。

9. 从磁力架或磁铁上取下离心管，加入 100 μ L 洗脱液，振荡混匀，65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，每隔 2-3 min 轻摇离心管混匀 3-5 次。

- 水浴前请先用洗脱液将离心管壁上的所有磁珠冲洗至离心管内。
- 如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。但应保证去离子水的 pH 值在 7.0-8.5 之间，若 pH 值不在此范围内，会影响洗脱效率及 DNA 质量。

10. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，小心吸取上清至新的离心管中，所得上清即目的基因组 DNA，可直接进行下游实验或于适当条件保存。

- 可先将离心管 10000 rpm ($\sim 6953 \times g$) 离心 1 min，再进行磁分离，以确保所有磁珠完全吸附至管壁。
- 尽量吸净上清，但请勿吸入磁珠，以免影响基因组 DNA 的纯度及 DNA 溶液的颜色。

【常见问题及参考意见】

1. 得率低

- 样品裂解不充分：血液细胞没有完全裂解，裂解时间不够或没有离心直接进行下一步操作；可适当延长裂解时间，最长不应超过 30 min；
- 结合不充分：结合过程中要使磁珠一直处于悬浮状态，并且充分颠倒混匀；
- 取样量大于说明书给出量：取样量请严格按照说明书操作；
- 操作过程中磁珠损失：操作过程中可能有少量磁珠沾在离心管管口或枪头上，应及时确保磁珠重悬至溶液中，避免磁珠损失；
- 洗脱液 pH 不在推荐范围内：应使用本试剂盒配套洗脱液，如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。但应保证去离子水的 pH 值在 7.0-8.5 之间，若 pH 值不在此范围内，会影响洗脱效率；
- 洗脱温度不符合要求：洗脱过程需要 65℃ 水浴。65℃ 条件下磁珠与基因组 DNA 的作用力减弱，释放吸附的大量基因组 DNA，而常温条件下只能少量的基因组 DNA。

2. DNA 条带弥散，DNA 断裂、降解

- 样品不新鲜：请尽量选择新鲜的血液样品；
- 裂解时间太长：裂解时间不要超过 30 min；
- 样品没有按要求保存或反复冻融：需要保存的样品请分装后保存至 -80℃，避免反复冻融造成 DNA 降解；
- 操作过程过于剧烈：操作过程动作尽量温和，避免 DNA 被机械打断；
- 提取后模板 DNA 放置时间太长：提取后如有需要，请尽量及时进行凝胶电泳实验。短期内可置于 4℃ 保存，长期请置于 -20℃ 保存（尽量注意避免反复冻融）。

3. DNA 溶液有颜色

- 洗涤过程不充分：如果结合后磁珠呈团状、丝状或颗粒状，可适当增加振荡力度及次数；
- 裂解不充分：细胞充分裂解、适当增加裂解液 B01 和 B02 的用量，也可适当延长裂解时间；
- 样品用量大于说明书给出量而其他试剂用量没有相应调整：严格按照说明书操作，如果需要增大样本量，可以等比例大裂解液 B01、B02、蛋白酶 K 以及磁珠用量，洗脱液用量可不改变；
- DNA 溶液中混入磁珠：洗脱结束后，可先将离心管 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再进行磁分离，以确保所有磁珠完全吸附至管壁。为防止吸入磁珠，可重复进行磁分离一次。

4. DNA 样品不纯，干扰后续实验

- DNA 溶液有乙醇残留：吸弃废液时，请尽量吸净管盖及管底残液。为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。室温晾干至磁珠表面无反光、无液体挂壁；
- 磁珠洗涤不充分：加入 70% 乙醇时，请确保所有磁珠均重悬于液体中，并充分振荡混匀；
- DNA 溶液中吸入磁珠：如果不小心吸入磁珠，请将上清液返回原管，待磁珠完全吸附至管壁后重新吸取上清。或者将吸取的上清液 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再取上清；
- DNA 溶液中含有蛋白质等杂质：建议适当减少样品用量；
- DNA 溶液中含有轻微盐离子等杂质，此为洗脱液正常现象，不影响下游实验。如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。为方便实验，可将获得的 DNA 溶液置于 -20℃ 环境分装保存。

【生产单位】

公司名称：南京东纳生物科技有限公司

公司地址：南京市江宁区龙眠大道 568 号南京生命科技小镇 5 号楼北楼 6-7 楼

公司电话：025-8347 5811

公司邮箱：maglab@163.com

公司网址：www.nanoeast.net