

磁珠法干血斑基因组 DNA 提取试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：磁珠法干血斑基因组 DNA 提取试剂盒

【包装规格】

100T/盒（货号 NG-MB0073-100T），300T/盒（货号 NG-MB0073-300T）

【预期用途】

该产品适用于血斑基因组 DNA 提取。

【检测原理】

DNA 在高盐条件下结合于硅基包被的 Magbeads 表面，经过多次清洗，去除杂蛋白等，低盐条件下洗脱，得到高纯度的基因组 DNA。

【主要组成成分】

组分	NG-MB0073-100T	NG-MB0073-300T
裂解液	55mL	165mL
清洗液	30mL (加入 39mL 无水乙醇)	90mL (加入 117mL 无水乙醇)
洗脱液	12mL	36mL
磁珠悬液	2*1.05mL	6.5mL
蛋白酶 K	2*1.05mL	6.5mL

【储存条件及有效期】

磁珠悬液于 2-8°C 保存，蛋白酶 K 于 4°C 以下保存，其余试剂常温保存，有效期皆为一年；可在 4-37°C 运输，运输时间不超过 14 天。

【选配试剂】

RNase A(100mg/mL)，核酸助沉剂（6μg/μL）

【自备试剂和仪器】

1. 试剂：无水乙醇、异丙醇、80%乙醇
2. 仪器：核酸提取仪、移液器、涡旋振荡器、恒温混匀仪、磁性分离架、离心管（2.0 mL）、96深孔板（2.2 mL）、离心机（20,000 g）、tip 头

【样本要求】

1. 样本适用类型：血斑、血卡等。
2. 使用保存要求：血斑、血卡最好使用新鲜样本，或者 4°C 存放少于 3 天的样本，避免使用反复冻融超过 3 次的样本。

【注意事项】

1. 初次使用全新试剂盒前，请按照清洗液的标签要求加入标注量无水乙醇稀释备用；
2. 磁珠严禁冷冻，磁珠悬液使用前应充分混匀；
3. 若使用 RNase A 或核酸助沉剂，应于在 -20°C 保存，避免反复冻融，建议分装冻存；

- 初次使用前，按照清洗液标签指示加入定量的无水乙醇；
- 每次使用前检查裂解液和清洗液是否出现析出，若有，可在 55°C 条件下重新溶解。

【单管手动操作步骤】

- 1. 样本处理：**将样本剪成 3×3 mm 大小斑片，转移至 2.0mL 离心管中，加入 500μL 裂解液和 20μL 蛋白酶 K 溶液，涡旋混匀。
- 2. 裂解：**将上述样本 60°C 温育 20min，期间每隔 5min 涡旋混匀一次（亦可 60°C 恒温震荡 20min），低速瞬离，收集管盖内壁的液滴，转移全部上清至新的离心管中。
 ✦ 注意：若需要去除 RNA，请在上述混合液中加入 4μL RNase A（100mg/mL）。
- 3. 结合 DNA：**向上清液中加入 300μL 异丙醇，20μL 磁珠悬液，涡旋充分混匀，于震荡混匀仪上室温震荡结合 5min。
 ✦ 注意：建议加入核酸助沉剂 1μL，可提高微量核酸样本基因组 DNA 提取量。
- 4. 磁性分离：**将离心管置于磁力架上，上下颠倒 2-3 次，静置待磁珠完全吸附，彻底去除上清液（全程保持离心管固定于磁力架上），期间避免接触磁珠。
- 5. 清洗：**将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入 600μL 清洗液，盖好离心管管盖，涡旋振荡 10s，确保磁珠充分混匀，然后涡旋振荡 1-2min，进行磁性分离。
- 6. 80%乙醇清洗：**再使用 600μL 80%乙醇同上述操作方法，清洗两次。
- 7. 除醇：**将离心管置于磁力架上，放置通风橱中，进行风干 3-5min（至磁珠表面看不到液体光亮面即可）。
- 8. 洗脱：**取出离心管，加入 50-100μL 洗脱液，涡旋混匀 20s，确保磁珠与洗脱液充分混匀，将离心管放于 60°C 水浴锅孵育 10min，其间涡旋混匀三次（亦可 60°C 恒温震荡 10min）。
- 9. 核酸转移：**将离心管置于磁力架上静置 1min，待磁珠完全吸附后将上清转移至新的离心管中，于 -20°C 保存备用。

【机提—16/32 通道核酸提取仪操作步骤】

1. 上样准备

在 96 孔板中分别参照下表用量加入各个相应孔位，可同步完成 16/32 个样品的处理

样品孔位	1、7	2、8	3、9	4、10	5、11	6、12
试剂	异丙醇 300μL	磁珠悬液 20μL、纯化 水 280μL	清洗液 600μL	80%乙醇 600μL	80%乙醇 600μL	洗脱液 60μL

2. 样本的溶解和裂解

- 1) 将样本剪成 3×3 mm 大小斑片，转移至 2.0mL 离心管中，加入 500μL 裂解液和 20μL 蛋白酶 K，涡旋混匀；
- 2) 将上述样本 60°C 温育 20min，期间每隔 5min 涡旋混匀一次（亦可 60°C 恒温震荡 20min），温育结束后低速瞬离，收集管盖内壁的液滴，待用。

✦ 注意：若需要去除 RNA，请在上述混合液中加入 4μL RNase A（100mg/mL）。

3. 上机提取

- 1) 在 96 孔板的 1、7 列孔位加入溶解消化后的血斑样本全部上清，将准备好的 96 孔样品板放入核酸提取仪中，并插入磁棒套；
- 2) 打开仪器的操作程序，选中相应程序，单击“运行”开始提取。

✦ 注意：建议在 1、7 列孔位加入核酸助沉剂 1μL，可提高微量核酸样本基因组 DNA 提取量。

4. 核酸转移

程序运行完毕，取下 96 孔板，将洗脱液转移至干净的离心管或者 PCR 板中，做好标记，-20°C 保存备用，此时可以弃去 96 孔板。

32 通道核酸提取仪器程序各参数设置如下：

步骤编号	孔位	名称	等待时间(min)	混合时间(min)	吸磁时间(sec)	容积(μL)	混合速度	温度(°C)
1	2	转移磁珠	0	0	40	300	3	OFF
2	1	结合 DNA	0	5	40	750	3	OFF
3	3	清洗 1	0	2	40	600	3	OFF
4	4	清液 2	0	2	40	600	3	OFF
5	5	75%乙醇清洗	0	2	40	600	3	OFF
6	6	洗脱	3	6	50	60	3	60
7	5	弃磁珠	0	1	0	600	3	OFF

【机提—96 通道核酸提取仪操作步骤】
1. 上样准备

在 96 孔板中分别参照下表用量加入每个相应工位，可同步完成 96 个样品的处理。

样品工位	1	2	3	4	5	6
试剂	异丙醇 300μL	磁珠悬液 20μL、纯 化水 280μL	清洗液 600μL	80%乙醇 600μL	80%乙醇 600μL	洗脱液 60μL

2. 样本的溶解和裂解

- 1) 将样本剪成 3×3 mm 大小斑片，转移至 2.0mL 离心管中，加入 500μL 裂解液和 20μL 蛋白酶 K，涡旋混匀；
- 2) 将上述样本 60°C 温育 20min，期间每隔 5min 涡旋混匀一次（亦可 60°C 恒温震荡 20min），温育结束后低速离心，收集管盖内壁的液滴，待用。

✧ 注意：若需要去除 RNA，请在上述混合液中加入 4μL RNase A（100mg/mL）。

3. 上机提取

将溶解消化后的血斑样本全部上清转移至工位 1 的 96 深孔板内，再将准备好的 96 孔样品板按序放入核酸提取仪或同类型提取仪中，并插入磁棒套；打开仪器的操作程序，选中对应程序，点击运行，开始提取。

4. **核酸转移：** 仪器运行结束后，将第 6 工位的洗脱液直接封膜或转移至干净的无核酸酶的离心管中，于 -20°C 保存备用。

96 通道核酸提取仪器程序各参数设置如下：

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步
工位	2	1	3	4	5	6	5
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:03:00	00:00:00
混合模式	3	3	3	3	3	3	3
混合时间	00:00:00	00:05:00	00:02:00	00:02:00	00:02:00	00:06:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:00:00
体积	300 μ L	750 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	60 μ L	600 μ L
温度	—	—	—	—	—	60 $^{\circ}$ C	—