

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	3
方案 1: 2ml 游离 DNA 的 KingFisher Flex 抽提方案	4
方案 1: 4ml 游离 DNA 的 KingFisher Flex 抽提方案	4
常见问题回答	8

版本: 2019-09

## 简介

MagPure Circulating DNA Riche Maxi KF Kit 为血清、血浆等无细胞液体样品的游离 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。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher Duo 上使用。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。吸附了核酸的纳米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 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计的，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。其它提取仪或移液工作站也可以使用。

MagPure Circulating DNA Rich Maxi KF 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。

## 保质期

MagPure Circulating DNA Maxi KF Kit 除 MagPure Particles G、Carrier RNA 和 Proteinase K 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。MagPure Particles G、Carrier RNA 和 Proteinase K 干粉在室温下运输。收到试剂盒后，把 Proteinase K/Carrier RNA 保存于-20℃。MagPure Particles G/MagBind Particles 保存于 2-8℃。

## 组 成

### MagPure Circulating DNA Riche Maxi KF Kit

产品编号	MD5436-00*	MD5436-01	MD5436-02
纯化次数(4ml)	20 次	50 次	200 次
MagPure Particle G	4 ml	10 ml	40 ml
Carrier RNA	120 µg	120 µg	2 × 120 µg
Proteinase K	50 mg	120 mg	480 mg
Protease Dissolve Buffer	5 ml	10 ml	30 ml
Buffer SDS(20%)	5 ml	15 ml	30 ml
Buffer MLK	60 ml	150 ml	550 ml
Select Solution	30 ml	60 ml	220 ml
Buffer BST1	40 ml	120 ml	400 ml
Buffer MKW1 *	100 ml	250 ml	3 × 500 ml
Buffer MW2 *	50 ml	100 ml	4 × 100 ml
Elution Buffer	10 ml	20 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 准备工作

- 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, 保存于-20℃。
- Buffer MW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- 加入 500µl Elution Buffer 和 2ul Proteinase K 至 Carrier RNA 中, 涡旋混匀 15 秒, 室温放置 10 分钟, 完全溶解后保存于-20 度。

## 方案 1. 2ml 游离 DNA 在 KingFisher Flex 的标准方案

该方案适合于从 2ml 血清，血浆或其它无细胞样品中直富集提取游离 DNA。

1. 在 10~15ml 离心管中，加入 2.0ml 血清或血浆，然后加入 100 $\mu$ l Proteinase K， 5 $\mu$ l Carrier RNA 和 100 $\mu$ l Buffer SDS，涡旋混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟。
2. 加入 2.4ml Buffer MLK、100 $\mu$ l MagBind Particles 和 Select Solution (400 $\mu$ l、500 $\mu$ l、600 $\mu$ l 或 700 $\mu$ l) 至样品中，颠倒混匀 10 分钟。  
(400 $\mu$ l: 去除 1KB 以上的片段，500 $\mu$ l 去除含 700bp 以上的片段，600 $\mu$ l 去除含 500bp 以上的片段，700 $\mu$ l 去除含 400bp 以上的片段。这个范围为外源添加 DNA Marker 的数据，用户可根据实验结果进行调整。)
3. 3,000~5,000  $\times$  g 离心 10 分钟。(丢弃这一步磁珠，磁珠吸附了大片段 DNA)
4. 把上清液平均分成两份转移至样品板 1 和样品板 2。
5. 它按下表把其它试剂转移 24 孔板中，并用标签笔标下板的名称。

板的名称	板类型	试剂名称与用量
Elution	24 孔板	Elution Buffer: 70 $\mu$ l
Wash 4	24 孔板	无水乙醇: 500 $\mu$ l
Wash 3	24 孔板	Buffer MW2: 4000 $\mu$ l
Wash 2	24 孔板	Buffer MW2: 4000 $\mu$ l
Wash 1	24 孔板	Buffer MKW1: 4000 $\mu$ l 180 $\mu$ l MagPure Particles G Comb(磁力套)
Sample 1	24 孔板	Buffer BST1: 0.8 ml 上清液: 2.5~2.65ml
Sample 2	24 孔板	Buffer BST1: 0.8 ml 上清液: 2.5~2.65ml

6. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure\_ctDNA\_2ml 程序。
7. 执行程序，按提示将装有样品或试剂的 96 孔板放到仪器对应的槽中。
8. 约 35 分钟后程序执行完毕。取出 DNA 样品，把 DNA 保存于-20°C。

## 方案 2. 4ml 游离 DNA 在 KingFisher Flex 的标准方案

该方案适合于从 4ml 血清，血浆或其它无细胞样品中直富集提取游离 DNA。

1. 在 15ml 离心管中，加入 4.0ml 血清或血浆，然后加入 200 $\mu$ l Proteinase K， 5 $\mu$ l Carrier RNA 和 200 $\mu$ l Buffer SDS，涡旋混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟。
2. 加入 4.8 ml Buffer MLK、200 $\mu$ l MagBind Particles 和 Select Solution (800 $\mu$ l、1000 $\mu$ l、1200 $\mu$ l 或 1400 $\mu$ l) 至样品中，颠倒混匀 10 分钟。  
(800 $\mu$ l:去除 1KB 以上的片段, 1000 $\mu$ l 去除含 600bp 以上的片段, 1200 $\mu$ l 去除含 500bp 以上的片段, 1400 $\mu$ l 去除含 400bp 以上的片段。这个范围为外源添加 DNA Marker 的数据, 用户可根据实验结果进行调整。)
3. 3,000~5,000  $\times$  g 离心 10 分钟。(丢弃这一步磁珠, 磁珠吸附了大片段 DNA)
4. 把上清液平均分成三份转移至样品板 1、样品板 2 和样品板 3。
5. 它按下表把其它试剂转移 24 孔板中, 并用标签笔标下板的名称。

板的名称	板类型	试剂名称与用量
Elution	24 孔板	Elution Buffer: 75 $\mu$ l
Wash 4	24 孔板	无水乙醇: 500 $\mu$ l
Wash 3	24 孔板	Buffer MW2: 4000 $\mu$ l
Wash 2	24 孔板	Buffer MW2: 4000 $\mu$ l
Wash 1	24 孔板	Buffer MKW1: 4000 $\mu$ l 180 $\mu$ l MagPure Particles G Comb(磁力套)
Sample 1	24 孔板	Buffer BST1: 1.0 ml 上清液: 3.3~3.5ml
Sample 2	24 孔板	Buffer BST1: 1.0 ml 上清液: 3.3~3.5ml
Sample 3	24 孔板	Buffer BST1: 1.0 ml 上清液: 3.3~3.5ml

6. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure\_ctDNA\_6ml 程序。
7. 执行程序，按提示将装有样品或试剂的 96 孔板放到仪器对应的槽中。
8. 约 35 分钟后程序执行完毕。取出 DNA 样品，把 DNA 保存于-20°C。

## 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 的技术人员可随时为您提供服务，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。

现象及原因	解决方法
<b>DNA 有颜色</b>	
Proteinase K 与 Buffer MLK 不能预先混合	Proteinase K 与 Buffer MLK 不能预先混合。样品与蛋白酶 K 先进行混匀后，才能加入 Buffer MLK。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
血液贮藏条件不正确	血液样品因贮藏条件不对，出现凝固块。用移液枪吸打几次打散血液样品的凝固块。
<b>DNA 产量低</b>	
样品中细胞或病毒含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩于 250 $\mu$ l。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
Buffer MW2 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。
MagPure Particles G 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles G 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles G。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率