

M6399 Mag-Bind[®] Blood&Tissue DNA HDQ 96 Kit 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释以下试剂:

- 使用【无水乙醇】对 SPM Wash Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存。

| 货号 | 加入量 |
|----------|------------|
| M6399-00 | 70mL |
| M6399-01 | 140mL (每瓶) |

- 使用【无水乙醇】对 VHB Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存。

| 货号 | 加入量 |
|----------|------------|
| M6399-00 | 70mL |
| M6399-01 | 140mL (每瓶) |

- 使用【异丙醇】对 HDQ Binding Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存。

| 货号 | 加入量 |
|----------|-------|
| M6399-00 | 40mL |
| M6399-01 | 160mL |

- 使用前将 Mag-Bind[®] Particles HDQ 颗粒完全重悬。在使用过程中, 磁珠颗粒必须完全悬浮, 以确保正确结合吸附。

提取步骤:

A. 血液提取方案 (250μl)

1. 将血液样品加入到 96 孔深孔板 (2mL) 中。如果血液样品体积小于 250μl, 则加入 PBS (客户自备) 或 Elution Buffer 将体积调整至 250μl。
2. 向每个样品孔中加入 20μl Proteinase K Solution, 即刻进入下一步操作。
选做: 向每个样品孔中加入 5μl RNase A, 涡旋或上下吸打混匀 20 次。
3. 向每个样品孔中加入 290μl AL Buffer, 最大速度涡旋或上下吸打混匀 20 次。充分混匀对于获得良好的产量至关重要。

Note: 对于自动化仪器, 磁头拍打混合可有效帮助提高产量, 建议使用。

4. 70°C 孵育 10min;
5. 向每个样品孔中加入 400μl HDQ Binding Buffer 和 20μl Mag-Bind[®] Particles HDQ, 最大速度涡旋 10min;

Note: HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。

6. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液

重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

7. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600 μ l VHB Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

Note：VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。完全重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ 有利于获得良好的纯度。

8. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

9. 重复步骤 7-8，再次加入 VHB Buffer 洗涤；

10. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600 μ l SPM Wash Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ，室温静置 1min；

Note：SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

12. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上，加入 500 μ l 无酶水并立即吸出，注意不要将无酶水留在 Mag-Bind[®] Particles HDQ 中超过 60s；

13. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 50-200 μ l Elution Buffer，上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

Note：将 Elution Buffer 放置在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入有助于提高产量。

14. 室温静置 5min；

15. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中，保存到 -20 $^{\circ}$ C。

B. 组织提取方案

1. 每个孔称量不超过 10mg 的样品组织，转移到 96 孔深孔板中；

Note：适当剪碎组织样品有利于充分裂解。

2. 向每个样品孔中加入 250 μ l TL Buffer 和 20 μ l Proteinase K Solution，涡旋混匀；

3. 将 96 孔板放置到 55 $^{\circ}$ C 振荡水浴中；

Note：如果不具备振荡水浴锅，可在放到 55 $^{\circ}$ C 水浴，水浴期间每 20-30min 取出涡旋混匀一次。孵育裂解时间取决于组织样品的数量和类型，通常裂解时间不需要超过 3h。但对于有些困难样品可能需要孵育过夜裂解。

Important：有些组织中可能含有不能被蛋白酶消化的物质，可将 96 孔深孔板以最大速度离心后，将澄清的裂解液转移到新的 96 孔深孔板上。

选做：对于 RNA 含量比较丰富的肝脏组织，使用该试剂盒进行纯化后的产物，不会干扰到后续的 PCR，若需除去 RNA，可在此步骤加入 5 μ l RNase A（对于 10mg 样品量），在室温下静置 2min，继续步骤 4；

4. 最大速度离心 5min 沉淀未能完全消化的组织颗粒和毛发等；
5. 小心转移 200 μ l 上清液至新的 96 孔深孔板中，注意不要转移到不溶的沉淀；
6. 向每个样品孔中加入 230 μ l AL Buffer，最大速度涡旋 10min 或上下吸打混匀 20 次。充分混匀对于获得良好的产量至关重要。

Note：对于自动化仪器，磁头拍打混合可有效帮助提高产量，建议使用。

7. 向每个样品孔中加入 320 μ l HDQ Binding Buffer 和 20 μ l Mag-Bind[®] Particles HDQ，最大速度涡旋混匀 10min；

Note：HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。

8. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；
9. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600 μ l VHB Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

Note：VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；
11. 重复步骤 9-10，再次加入 VHB Buffer 洗涤；

12. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600 μ l SPM Wash Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ，室温静置 1min；

Note：SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；
14. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上，加入 500 μ l 无酶水并立即吸出，注意不要将无酶水留在 Mag-Bind[®] Particles HDQ 中超过 60s；

15. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 100-200 μ l Elution Buffer，上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

Note：将 Elution Buffer 放置在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入有助于提高产量。

16. 室温静置 5min；
17. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中，保存到 -20 $^{\circ}$ C。

C. 培养细胞提取方案

1. 准备细胞悬浮液：

a) 在实验前，应先将细胞样品解冻，离心沉淀细胞，并用预冷的 PBS (4°C) 洗涤细胞沉淀，后加入 180µl 预冷的 PBS 重悬细胞，继续步骤 2；

b) 对于悬浮培养的细胞，在离心管中以 1,200xg 离心 5×10^6 个细胞，弃上清，并用预冷的 PBS (4°C) 洗涤细胞沉淀一次，后加入 180µl 预冷的 PBS 重悬细胞，继续步骤 2；

c) 对于单层生长的细胞，加入胰蛋白酶处理，或使用细胞刮片收集细胞，并用预冷的 PBS (4°C) 洗涤细胞沉淀两次，后加入 180µl 预冷的 PBS 重悬细胞，继续步骤 2；

2. 加入 20µl Proteinase K Solution 和 230µl AL Buffer，最大速度涡旋混匀 10min，充分混匀对于获得良好的产量至关重要。

Note：对于自动化仪器，磁头拍打混合可有效帮助提高产量，建议使用。

3. 放置到 55°C 振荡水浴中孵育 10min；

Note：如果不具备振荡水浴锅，可在放到 55°C 水浴，水浴期间每 2-3min 取出涡旋混匀一次。

4. 将样品转移到 96 孔深孔板中；

选做：向每个样品孔中加入 5µl RNase A，涡旋或上下吸打混匀 20 次

5. 向每个样品孔中加入 320µl HDQ Binding Buffer 和 20µl Mag-Bind[®] Particles HDQ，最大速度涡旋混匀 10min；

Note：HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。

6. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

7. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600µl VHB Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

Note：VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

9. 重复步骤 7-8，再次加入 VHB Buffer 洗涤；

10. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600µl SPM Wash Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ，室温静置 1min；

Note：SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ；

12. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上，加入 500µl 无酶水并立即吸出，注意不要将无酶水留在 Mag-Bind® Particles HDQ 中超过 60s；

13. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 100-200µl Elution Buffer，上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind® Particles HDQ；

Note: 将 Elution Buffer 放置在 70°C 预热后再加入有助于提高产量。

14. 室温静置 5min；

15. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind® Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中，保存到 -20°C。

D. 唾液提取方案

1. 将 250 µl 稳定的唾液样品（如 DNA Genotek Oragene®, Mawi iSWAB™, Biomatrix® DNAGard® Saliva）加入到 96 孔深孔板中；

2. 向每个样品孔中加入 20µl Proteinase K Solution；

选做：向每个样品孔中加入 5µl RNase A，涡旋混匀或上下吸打混匀 20 次。

3. 向每个样品孔中加入 290µl AL Buffer，最大速度涡旋混匀 10min 或上下吸打混匀 20 次，充分混匀对于获得良好的产量至关重要。

Note: 对于自动化仪器，磁头拍打混合可有效帮助提高产量，建议使用。

4. 向每个样品孔中加入 400µl HDQ Binding Buffer 和 20µl Mag-Bind® Particles HDQ，最大速度涡旋混匀 10min；

Note: HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind® Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。

5. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind® Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind® Particles HDQ；

6. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600µl VHB Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind® Particles HDQ；

Note: VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

7. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind® Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind® Particles HDQ；

8. 重复步骤 6-7，再次加入 VHB Buffer 洗涤；

9. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600µl SPM Wash Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind® Particles HDQ，室温静置 1min；

Note: SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 吸除上清, 注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;
11. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上, 加入 500 μ l 无酶水并立即吸出, 注意不要将无酶水留在 Mag-Bind[®] Particles HDQ 中超过 60s;
12. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下, 向每个样品孔中加入 100-200 μ l Elution Buffer, 上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;
Note: 将 Elution Buffer 放置在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入有助于提高产量。
13. 室温静置 5min;
14. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中, 保存到-20 $^{\circ}$ C。

E. 口腔拭子提取方案

1. 将口腔刷或拭子面条切断, 放入到 96 孔深孔板中;
2. 向每个样品孔中加入 290 μ l AL Buffer 和 250 μ l Elution Buffer;
Note: AL Buffer 和 Elution Buffer 混匀后加入。
3. 向每个样品孔中加入 20 μ l Proteinase K Solution;
4. 放置到 55 $^{\circ}$ C 振荡水浴中孵育 10min;
Note: 如果不具备振荡水浴锅, 可在放到 55 $^{\circ}$ C 水浴, 水浴期间每 5-10min 取出涡旋混匀一次。
5. 3,000xg 离心 2min;
6. 将 500 μ l 上清裂解液转移到新的 96 孔深孔板中, 注意不要转移到沉淀的不溶物;
选做: 向每个样品孔中加入 5 μ l RNase A, 涡旋混匀或上下吸打混匀 20 次。
7. 向每个样品孔中加入 350 μ l HDQ Binding Buffer 和 20 μ l Mag-Bind[®] Particles HDQ, 最大速度涡旋混匀 10min;
Note: HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。
8. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 吸除上清, 注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;
9. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下, 向每个样品孔中加入 600 μ l VHB Buffer, 上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;
Note: VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
10. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液

重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind® Particles HDQ；

11. 重复步骤 9-10，再次加入 VHB Buffer 洗涤；

12. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 600µl SPM Wash Buffer，上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind® Particles HDQ，室温静置 1min；

Note: SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind® Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，吸除上清，注意不要碰到 Mag-Bind® Particles HDQ；

14. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上，加入 500µl 无酶水并立即吸出，注意不要将无酶水留在 Mag-Bind® Particles HDQ 中超过 60s；

15. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下，向每个样品孔中加入 100-200µl Elution Buffer，上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind® Particles HDQ；

Note: 将 Elution Buffer 放置在 70°C 预热后再加入有助于提高产量。

16. 室温静置 5min；

17. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind® Particles HDQ，静置至溶液重新变澄清，小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中，保存到 -20°C。

F. 小鼠尾巴提取方案

1. 剪下 2-5mm 的小鼠尾巴，切成几块后将碎片转移到 96 孔深孔板中；

Note: 培养小鼠注意遵守有关动物安全和人道待遇的所有规定。小鼠龄不宜超过 6 周，对于周龄越大的小鼠越难裂解，可能会导致 DNA 提取效果不佳，如有可能，取 2-4 周龄的小鼠尾部活检，可将样品放到 -70°C 中保存。

2. 向每个样品孔中加入 250µl TL Buffer 和 20µl Proteinase K Solution，涡旋混匀；

3. 放置到 55°C 振荡水浴中孵育 1-4h 直至完全裂解；

Note: 如果不具备振荡水浴锅，可在放到 55°C 水浴，水浴期间每 20-30min 取出涡旋混匀一次。不完全裂解可能会明显降低 DNA 的产量。尾部是否能完全裂解取决于样品剪切的长度和动物的年龄，如：对于 2 周龄的小鼠，5mm 的尾部片段通常可在 2h 内裂解。对于年龄较大的动物，可能需要过夜孵育提高产量。注意：骨骼和头发不会消化溶解。

4. 最大速度离心 5min 沉淀不溶物和毛发；

5. 小心转移 200µl 上清液至新的 96 孔深孔板，注意不要转移到任何的不溶物；

选做：小鼠尾部组织中可能含有 RNA，这不会干扰 PCR 反应，但可能会对其他酶促反应有影响。要去除 RNA，可加入 5µl RNase A，在室温下静置 2min。

6. 向每个样品孔中加入 230µl AL Buffer，最大速度涡旋混匀 10min 或上下吸打 10 次，

充分混匀对于获得良好的产量至关重要。

Note: 对于自动化仪器, 磁头拍打混合可有效帮助提高产量, 建议使用。

7. 向每个样品孔中加入 320 μ l HDQ Binding Buffer 和 20 μ l Mag-Bind[®] Particles HDQ, 最大速度涡旋混匀 10min;

Note: HDQ Binding Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。HDQ Binding Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles HDQ 可在使用前混匀后加入。建议在每次使用前混匀。

8. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 吸除上清, 注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

9. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下, 向每个样品孔中加入 600 μ l VHB Buffer, 上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

Note: VHB Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 吸除上清, 注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

11. 重复步骤 9-10, 再次加入 VHB Buffer 洗涤;

12. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下, 向每个样品孔中加入 600 μ l SPM Wash Buffer, 上下吸打 20 次或涡旋 1min 重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 室温静置 1min;

Note: SPM Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 吸除上清, 注意不要碰到 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

14. 将 96 孔深孔板保持在磁力分离装置上, 加入 500 μ l 无酶水并立即吸出, 注意不要将无酶水留在 Mag-Bind[®] Particles HDQ 中超过 60s;

15. 将 96 孔深孔板从磁力分离装置上取下, 向每个样品孔中加入 100-200 μ l Elution Buffer, 上下吸打 50 次重悬 Mag-Bind[®] Particles HDQ;

Note: 将 Elution Buffer 放置在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入有助于提高产量。

16. 室温静置 5min;

17. 将 96 孔深孔板放在磁力分离装置上吸附 Mag-Bind[®] Particles HDQ, 静置至溶液重新变澄清, 小心转移含有 DNA 的上清液至新的 96 孔深孔板中, 保存到 -20 $^{\circ}$ C。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准