



08-05

Nucleic Acid Purification Kit

**MagExtractor<sup>®</sup>**

**– Genome –**

(Code No :NPK-100, NPK-101)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

## 目 录

[1] 前言 .....	1
[2] 使用前须知 .....	1
[3] 试剂盒中所包含的物品 .....	1
[4] 操作程序 .....	2
1. 试剂盒以外所需要的其他物品 .....	2
2. 样品的前处理方法 .....	3
3. 抽提流程 .....	5
4. 手动法抽提Genomic DNA .....	5
5. 用MFX-2000 抽提Genomic DNA .....	11
6. 抽提后分析 .....	16
[5] 疑难解答 .....	17
[6] 参考文献 .....	19

## 【 注意 】

本试剂盒中所包含的都是科研用试剂。请不要用于诊断，临床等场合。在使用本试剂盒的时候，请严格遵守实验室的基本注意事项，并注意安全。

- 对于 PCR 法，Hoffmann-La Roche 公司保留专利。
- MagExtractor<sup>®</sup>是东洋纺织株式会社的登录商标。
- FALCON<sup>®</sup>是BECTON DICKINSON公司的登录商标。



## [1] 前言

MagExtractor<sup>®</sup>-Genome-利用Chaotropic（盐）存在的情况下，DNA能吸附在硅胶上的特性<sup>1), 2)</sup>，用于Genomic DNA的纯化。本试剂盒通过使用自动核酸抽提装置MFX-2000，能够方便地从全血、培养细胞等生物样品中抽提出高纯度的Genomic DNA。另外，本试剂盒也可以作为手动抽提用试剂盒使用。

## 特征

- 由于无需乙醇沉淀操作、离心分离操作等，可在短时间完成抽提。
- 不含苯酚及氯仿等危险物质。
- 从全血中直接抽提 DNA，无需进行复杂的血细胞分离操作。
- 抽提出的 DNA 回收于灭菌水中，能够直接用于 PCR 等实验。

## [2] 使用前须知

MagExtractor<sup>®</sup>-Genome-主要用于从以下样品中抽提DNA。

对应样品	获取量	纯度 (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 比例)	用途
血液	2 μg / 100 μl 全血		
培养细胞	3 μg / 5 × 10 <sup>5</sup> cell (HeLa)		
组织	5 μl / 5mg 组织 (猪的精巢)	1.8 ± 0.1	PCR
鼠尾	3 μl / 2mm 尾巴		

- 在用于组织和鼠尾的情况下，需要进行前处理（匀浆和溶解）。详细请参照 4~5 页。
- 获取量会因样品的种类以及状态而有所变动。上表中数据仅作参考。
- 此外，只需通过适当的前处理，也能够从石蜡包埋组织切片，酵母，乳酸菌等中抽提 DNA（详细情况请拨打本公司的技术服务热线）。
- 请在室温（20~30℃）下使用本试剂盒。如果使用时温度过低或过高，将无法完全发挥本试剂盒的性能。

## [3] 试剂盒中所包含的物品

MagExtractor<sup>®</sup>-Genome-中含有 50 次份(Code No: NPK-100)和 100 次份(Code No: NPK-101) 的 2 种。

**NPK-100（50 次份）**

50ml . 溶解·吸附液（含蛋白质变性剂）	4℃下保存
100ml ..... 洗净液（含蛋白质变性剂）	4℃下保存
3ml ..... 磁珠	4℃下保存

**NPK-101（100 次份）**

100ml 溶解·吸附液（含蛋白质变性剂）	4℃下保存
200ml ..... 洗净液（含蛋白质变性剂）	4℃下保存
6ml ..... 磁珠	4℃下保存

- 所有试剂都在 4℃ 下保存，使用前请先恢复到室温。如果是在短时间内（1 个月内）使用，也可以在室温下（25℃）保存。
- 溶解·吸附液和洗净液中含有高浓度的蛋白质变性剂，使用时请格外小心，并请戴上手套做好防护措施。万一试剂沾在手或者皮肤上，请用清水充分清洗。如若碰到眼睛，请立刻用清水清洗，然后去医院就诊。
- 使用本公司的自动核酸抽提装置 MFX-2000 时，请在指定的试管内注入相应的剂量后放置在规定位置。

## [4] 操作程序

### 1. 试剂盒以外所需要的其他物品

#### (1) 试剂

- 灭菌水（双蒸水或者 milliQ 水经高温高压湿热灭菌后所得）
- 乙醇溶液（使用 MFX-2000 进行自动抽提时使用 99.5% 以上的特级品，使用手动抽提时使用 70% 乙醇溶液）

#### (2) 器具·器材

- 微量移液器
- 微量移液器用 Tip
- 匀浆器（微型试管用/组织处理用）
- 台式离心机（能够达到 3,000~10,000rpm 左右的旋转速度）

使用 MFX-2000 时

- 抽提专用试管（Code No: MFX-301）

- 带滤芯 Tip 头 (Code No: MFX-401)
- 离心管 (50ml用, 15ml用, 2ml用)<sup>1)</sup>

使用手动法时

- 1.5ml 离心管
- 1.5ml 离心管用磁性台架 (市场上有售, 也可用离心法代替)
- 涡旋振荡器 (精工公司制造的 MT-360 等)

---

\*<sup>1)</sup>设置试剂用离心管请使用以下产品。50ml离心管: FALCON<sup>®</sup> 2170, 15ml离心管: FALCON<sup>®</sup> 2196 (都是BECTON DICKINSON公司生产), 2ml离心管: Assist试管No 72.694 (Assist公司生产)。

## 2. 样品的前处理方法

本试剂盒可用于于全血和培养细胞等生物样品。不同种类的样品, 准备步骤也会有所不同。另外, 请严格控制样品量。如果样品量超过规定标准, 抽提效果会有很大影响; 另外, 也有可能使机器产生故障。

### (1) 全血

将 100  $\mu$ l 均匀混合的血液加入离心管<sup>1)</sup> 内。

- 除了新鲜血液外, 也可以使用EDTA或肝素进行过抗凝固处理后的血液, 以及冻结保存后解冻出来的血液等<sup>2)</sup>, 但肝素处理后的血液DNA会严重影响PCR效果。
- 血液量不足 100  $\mu$ l 时, 请添加溶解·吸附液以调整到 100  $\mu$ l。

### (2) 培养细胞

将PBS (Phosphate-Buffered Saline) 下回收的培养细胞  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cell 左右注入到Assist试管 (No 72.692) 或者 1.5ml离心管内, 离心分离 (6,000rpm, 5分钟) 后, 去除上清液。

- 细胞密度为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cell / 100  $\mu$ l 时, 也可直接取其中 100  $\mu$ l 用于抽提, 但最好先用 PBS 洗涤一遍。

### (3) 组织, 鼠尾

请从如下方法中选取一种进行样品的溶解处理。对于肝脏组织等多种组织样品, 不管使用哪种方法, Genomic DNA的抽提效率和纯度差别不大<sup>3)</sup>。

### ① 在溶解·吸附液中溶解样品

组织块（10mg以下）或者鼠尾（大约2~5mm）

|←850  $\mu$ l 溶解·吸附液

| 匀浆（使用微型匀浆器）

| 离心分离（10,000rpm., 5分钟）

上清液（约850  $\mu$ l）

- 将全部上清液加入离心管内。
- 上清液不足850  $\mu$ l时，请添加溶解·吸附液以调整到850  $\mu$ l。

---

\*<sup>1</sup>除了MFX-2000专用离心管(Code No: MFX-301)以外,还可以使用Assist离心管(No 72.692)或者1.5ml离心管等。

\*<sup>2</sup>使用长期存放的血液时,请务必确认是否已经凝固。凝固则会造成Tip堵塞。

\*<sup>3</sup>根据组织的种类以及状态,使用前处理②可能会使抽提效率提高。

### 通过Proteinase K消化来溶解样品

组织块（10mg以下）或者鼠尾（大约2~5mm）

|←90  $\mu$ l Proteinase K buffer（100mM NaCl, 10mM Tris-HCl  
（pH8.0）, 25mM EDTA）

|←5  $\mu$ l 10mg/ml Proteinase K（30U/mg）

|←5  $\mu$ l 10% SDS

| 55°C, 6~18hr.加温（途中倒转混合2, 3次, 进行充分消化）

| 离心分离（10,000rpm., 5分钟）

上清液（约100  $\mu$ l）

- 将全部上清液加入离心管内。
- 上清液不足100  $\mu$ l时，请添加溶解·吸附液以调整到100  $\mu$ l。



### 3. 抽提流程

以下是使用MagExtractor<sup>®</sup>-Genome-的抽提流程。

样品

|←溶解·吸附液..... [样品的溶解]

|←磁珠 ..... [Genomic DNA 的吸附]

| B/F 分离（固液分离）

|←洗净液..... [非特异性吸附物的去除]

| B/F 分离（固液分离）

|←70%乙醇溶液..... [蛋白质变性剂的去除]

| B/F 分离（固液分离）

|←溶出液（灭菌水）..... [DNA 从磁珠上溶解分离]

| B/F 分离（固液分离）

回收上清液（100 μl）

### 4. 手动法抽提 Genomic DNA

本试剂盒也能用于手动法抽提DNA<sup>1)</sup>。根据样品的种类，请按照以下步骤进行抽提操作。

- 不同种类的样品，准备步骤也会有所不同。详细事项请参照“样品前处理方法”（p4~5）。

<sup>\*1</sup> 如果样品量略有增减，试剂量也应相应按比例增减。

- 对于磁珠分离，推荐使用市场上销售的 1.5ml 微型试管用磁性台架，也可以通过台式离心机进行 3,000rpm 30 秒左右的离心来分离。
- 除了本试剂盒，还需要 70% 乙醇溶液和灭菌水。请将无水乙醇和灭菌水按 7: 3 的体积比混合均匀，制备成 70% 乙醇溶液（每个样品需要 1.8ml）。
- 抽提操作请全部在室温下进行。

## (1) 全血

- ①在 1.5ml 微型试管中注入 100  $\mu$ l 血液。
- ②添加 750  $\mu$ l 溶解·吸附液和 40  $\mu$ l 磁珠后，使用试管混合器剧烈混合 10 分钟。
  - 加入磁珠前，请务必将磁珠溶液充分混合后再使用。
  - 请调节搅拌速度，尽量剧烈，使得样品和磁珠充分混合。
- ③将离心管置于磁性台架上，放置 30 秒左右使磁珠聚集，然后去除上清液。
  - 如果离心管盖内侧粘有磁珠，可倾斜离心管数次，使磁珠完全聚集。
  - 置离心管于磁性台架上，用微量移液器去除上清液。
  - 尽可能完全地去除上清液，但尽量不要吸除磁珠。
- ④离心管中添加 900  $\mu$ l 洗净液后，使用涡旋振荡器剧烈混合 5 秒钟。
  - 请混合至磁珠均匀分散为止。
- ⑤将离心管置于磁性台架上，放置 30 秒左右使磁珠聚集，然后去除上清液。
  - 同③。
- ⑥重复步骤④～⑤。
- ⑦添加 900  $\mu$ l 70%乙醇溶液后，使用漩涡混合器剧烈混合 5 秒钟。
  - 请混合至磁珠均匀分散为止。
- ⑧将离心管置于磁性台架上，放置 30 秒左右使磁珠聚集，然后去除上清液。
  - 同③。
- ⑨重复步骤⑦～⑧。
- ⑩添加 100  $\mu$ l 灭菌水后，使用试管混合器混合 10 分钟，使 Genomic DNA 溶出。
  - 加入水时尽量不要碰到试管壁，直接加到离心管底部。
  - 和②一样，请调节搅拌速度，使得样品和磁珠充分混合，注意不要让液体碰到离心管盖内侧。
- ⑪将试管置于磁性台架上，通过放置 30 秒左右使磁珠聚集，然后将含有 Genomic DNA 的上清液回收至新的 1.5ml 离心管内。

**【操作流程】**

100  $\mu$ l 全血

|← 750  $\mu$ l 溶解·吸附液

|← 40  $\mu$ l 磁珠（充分振荡后的均匀混合物）

| 剧烈振荡 10min

| B/F 分离（固液分离）

|← 900  $\mu$ l 洗净液

| 剧烈振荡 5sec

进行 2 次

| B/F 分离（固液分离）

进行 2 次

|← 900  $\mu$ l 70%乙醇溶液

| 剧烈振荡 5sec

| B/F 分离（固液分离）

|← 100  $\mu$ l 灭菌水

| 剧烈振荡 10min

| B/F 分离（固液分离）

上清液

## (2) 培养细胞

- ① 将PBS (Phosphate-Buffered Saline) 下回收的培养细胞  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cell左右加入到 1.5ml离心管中，离心分离 (6,000rpm 5 分钟) 后，去除上清液。
- ② 添加 850  $\mu$ l 溶解·吸附液以及 40  $\mu$ l 磁珠后，使用试管混合器剧烈混合 10 分钟。
  - 加入磁珠前，请务必将磁珠溶液充分混合后再使用。
  - 请调节搅拌速度，尽量剧烈，使得样品和磁珠充分混合。
- ③ 执行(1)全血的步骤③~④ (p6~7)，最后将含有 Genomic DNA 的上清液回收至新的 1.5ml 离心管内。

## 【操作流程】

PBS下回收的培养细胞  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cell

- | 离心分离 (6,000rpm, 5min)
- | 去除上清液 (收集细胞)
- |← 850  $\mu$ l 溶解·吸附液
- |← 40  $\mu$ l 磁珠 (充分振荡后的均匀混合物)
- | 剧烈振荡 10min
- | B/F 分离 (固液分离)
- |← 900  $\mu$ l 洗净液
- | 剧烈振荡 5sec
- | B/F 分离 (固液分离)
- |← 900  $\mu$ l 70%乙醇溶液
- | 剧烈振荡 5sec
- | B/F 分离 (固液分离)
- |← 100  $\mu$ l 灭菌水
- | 剧烈振荡 10min
- | B/F 分离 (固液分离)

进行 2 次

进行 2 次

上清液

### (3) 组织，鼠尾（在溶解·吸附液中溶解样品的方法）

- ① 在 1.5ml 离心管中放入组织片（10mg 以下）或者鼠尾（2~5mm 左右），然后加入 850  $\mu$ l 溶解·吸附液，再使用匀浆器充分匀浆。
- ② 离心分离（10,000rpm, 5 分钟）后，将上清液放入新的 1.5ml 离心管内。
- ③ 加入 40  $\mu$ l 磁珠，然后使用涡旋振荡器剧烈混合 10 分钟。
  - 加入磁珠前，请务必将磁珠溶液充分混合后再使用。
  - 请调节搅拌速度，尽量剧烈，使得样品和磁珠充分混合。
- ④ 执行(1)全血的步骤③~④（p6~7），最后将含有 Genomic DNA 的上清液回收至新的 1.5ml 离心管内。

### 【操作流程】

组织片（10mg 以下）或者鼠尾（2~5mm 左右）

- |← 850  $\mu$ l 溶解·吸附液
- | 充分匀浆
- | 离心分离（10,000rpm, 5min）
- | 将上清液注入 1.5ml 离心管内
- |← 40  $\mu$ l 磁珠（充分振荡后的均匀混合物）
- | 剧烈振荡 10min
- | B/F 分离（固液分离）
- |← 900  $\mu$ l 洗净液
- | 剧烈振荡 5sec
- | B/F 分离（固液分离）
- |← 900  $\mu$ l 70%乙醇溶液
- | 剧烈振荡 5sec
- | B/F 分离（固液分离）
- |← 100  $\mu$ l 灭菌水
- | 剧烈振荡 10min
- | B/F 分离（固液分离）

进行 2 次

进行 2 次

上清液

#### (4) 组织，鼠尾（通过 Proteinase K 溶解样品的方法）

① 在 1.5ml 离心管中放入组织片（10mg 以下）或者鼠尾（2~5mm 左右），然后依次加入 90  $\mu$ l Proteinase K buffer（100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 25mM EDTA), 5  $\mu$ l 10mg/ml Proteinase K（30U/mg), 5  $\mu$ l 10%SDS, 充分混合后在 55°C 下加温 6~18 小时。

· 中途请再倒转混合 2, 3 次，使其充分消化。

② 离心分离（10,000rpm, 5 分钟）后，将上清液放入新的 1.5ml 微型试管内。

③ 加入 750  $\mu$ l 溶解·吸附液和 40  $\mu$ l 磁珠，然后使用试管混合器剧烈混合 10 分钟。

· 加入磁珠前，请务必将磁珠溶液充分混合后再使用。

· 请调节搅拌速度，尽量剧烈，使得样品和磁珠充分混合。

④ 执行(1)全血的步骤③~④（p6~7），最后将含有 Genomic DNA 的上清液回收至新的 1.5ml 微型试管内。

#### 【操作流程】

组织片（10mg 以下）或者鼠尾（2~5mm 左右）

|← 90 $\mu$ l Proteinase K buffer

|← 5 $\mu$ l 10mg/ml Proteinase K（30U/mg）

|← 5 $\mu$ l 10%SDS

| 55°C 下加温 6~18 小时

| 离心分离（10,000rpm, 5min）

| 将上清液注入 1.5ml 离心管内

|← 750  $\mu$ l 溶解·吸附液

|← 40  $\mu$ l 磁珠（充分振荡后的均匀混合物）

| 剧烈振荡 10min

| B/F 分离（固液分离）

|← 900  $\mu$ l 洗净液

| 剧烈振荡 5sec

□ 进行 2 次

- | B/F 分离（固液分离）
- | ← 900μl 70%乙醇溶液
- | 剧烈振荡 5sec
- | B/F 分离（固液分离）
- | ← 100μl 灭菌水
- | 剧烈振荡 10min
- | B/F 分离（固液分离）

进行 2 次

上清液

## 5. 用 MFX-2000 抽提 Genomic DNA

在使用前，请阅读 MFX-2000 的使用说明书。

### (1) 操作程序的选择

在 MFX-2000 中准备了以下 3 种用于抽提 Genomic DNA 的操作程序。请根据需要进行其一<sup>1)</sup>，在液晶画面上输入操作程序的号码。

操作程序名	输入号码	液晶画面显示内容	样品量
血液用	11	Genome: Blood	血液, Proteinase K 消化物等液体 (100 μl)
培养细胞用	12	Genome: Cell	培养细胞等细胞块
组织用	13	Genome: Tissue	组织等溶解物 (850 μl)

- 每次运转只能选择一个操作程序
- 各个样品的前处理方法请参照 4~5 页。
- 在 PBS 下回收的培养细胞的细胞密度为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 \text{ cell} / 100 \mu\text{l}$  时，请取其中的 100 μl 进行血液用操作程序（输入号码：11）。
- 对组织或者鼠尾等进行了方法①（在溶解・吸附液中溶解）的前处理时，请选择组织用操作程序（输入号码：13），进行了方法②（通过 Proteinase K 溶解）的前处理时，请选择血液用操作程序（输入号码：11）。
- 抽提必要时间为每个样品 11 分钟左右。样品数的不同，抽提时间也会有所不同。

**(2) 加温 block，回收 block 的温度设定**

冷却 block 设定为以下温度。

	加温 block	冷却 block
设定温度	OFF	10°C

- 因为不使用加温 block，请将电源设为 OFF。
- 使用简易保冷 block 时，请事先将保冷 block 在冷藏室或者低温室中进行冷却。简易保冷 block 能够对回收液进行短时间的保冷。

\*1 3 种 Genomic DNA 抽提用操作程序根据各自使用的样品量（液体量）以及前处理方法，已使“样品的溶解”工序的参数条件达到最优化。因此，即使是从同一个样品中进行抽提，也请选择与液体量和前处理方法相适应的操作程序。

**(3) 附带专用过滤器的 Tip 的安装**

安装附带专用过滤器的 Tip 于 Tip 架中。安装个数请参照下表。

- 请使用附带专用过滤器的 Tip（Code No: MFX-401）
- Tip 已经过电子射线照射灭菌。请戴好手套将专用 Tip 放置于 Tip 架中。
- 安装的 Tip 若多于下表所记的数量不会有影响。
- 关于 Tip 的安装位置请阅读 MFX-2000 的使用说明书。

操作程序号码	必要 Tip 数			操作程序号码	必要 Tip 数				
	11	12	13		11	12	13		
样品数	1	7	7	6	样品数	13	40	40	39
	2	9	9	8		14	42	42	41
	3	11	11	10		15	44	44	43
	4	13	13	12		16	46	46	45
	5	18	18	17		17	51	51	50
	6	20	20	19		18	53	53	52
	7	22	22	21		19	55	55	54
	8	24	24	23		20	57	57	56
	9	29	29	28		21	62	62	61
	10	31	31	30		22	64	64	63
	11	33	33	32		23	66	66	65
	12	35	35	34		24	68	68	67



#### (4) 专用试管的使用

将专用试管（Code No: MFX-301）如数置于抽提架的 A~F 及回收架上。

- 抽提架除了安置专用试管外，请不要用于其他用途。否则容易引起故障。
- 回收架中也可安装带螺旋帽的 1.5ml 试管<sup>1)</sup>
- 详细使用方法请阅读 MFX-2000 的使用说明书。

<sup>\*1</sup> Assist 试管（No 72.692）等。

#### (5) 试剂的使用

将试剂分别注入指定的试管，放在试剂架规定的位置。

- 根据样品数的不同需要的试剂量也会有所不同。请根据下页的表使用试剂。
- 磁珠在使用前充分搅拌，请确认均匀混合后再注入到 2ml 试管内。另外，放入磁珠后，请马上（10 分钟以内）启动装置。否则可能会引起获取量的参差不齐以及操作上的故障。
- 注入磁珠时请使用微量移液器。其他试剂注入时可以参考以试管刻度为标准。
- 抽提后的残留试剂可以再次使用，但是必须注意，如果长时间放置的话，可能会由于挥发等原因使得液体的组成发生变化。
- 本试剂盒内不含灭菌水和乙醇溶液（99.5% 以上的特级品），请自己准备。
- 如果选择操作程序 13，则无需安装溶解·吸附液。

试剂架内 置放位置	试剂名	试管容量	操作程序		
			11	12	13
1	灭菌水	50ml	要	要	要
2	洗净水	50ml	要	要	要
4	溶解·吸附液	50ml	要	要	不要
5	乙醇溶液	50ml	要	要	要
7	磁珠	2ml	要	要	要
9	灭菌水	15ml	要	要	要

## 【各试剂的注入量】

试剂名	灭菌水	洗净液	溶解・吸附液	乙醇溶液	磁珠	灭菌水
试管容量	50ml	50ml	50ml	50ml	2ml	15ml
置放位置	1	2	4	5	7	9

## 各试管中注入的试剂量 (ml)

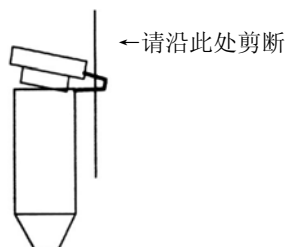
样品数	1	5 (20)	5	5 (20)	5	0.5 (1.5)	2 (5)
	2		5 (20)		5 (20)		
	3		10 (20)	10 (20)	15 (20)	0.8 (1.5)	
	4		15 (20)				
	5	10 (20)	10 (20)	15 (20)	0.8 (1.5)	3 (5)	
	6						20 (20)
	7		25 (35)	15 (20)	25 (35)		1 (1.5)
	8		30 (35)				
	9	15 (20)	20 (20)	30 (35)	1.3 (1.5)	4 (5)	
	10						35 (35)
	11		40 (45)	25 (35)	35 (45)		1.5 (1.5)
	12		45 (45)				
	13	25 (35)	25 (35)	35 (45)	1.5 (1.5)		
	14	30 (35)					
	15	15 (20)	20 (20)	30 (35)	1.3 (1.5)	4 (5)	
	16						35 (35)
	17		40 (45)	25 (35)	35 (45)		1.5 (1.5)
	18		45 (45)				
	19	25 (35)	25 (35)	35 (45)	1.5 (1.5)		
	20	30 (35)					
	21	15 (20)	20 (20)	30 (35)	1.3 (1.5)	4 (5)	
	22						35 (45)
	23		40 (45)	25 (35)	35 (45)		1.5 (1.5)
	24		45 (45)				

- 此处记载了根据样品数，各试剂注入量的标准。这里记载的剂量已足够充分，请按照此数值把试剂加入到试管内即可。
- 括号内的数值标识了注入到试管中时允许的最大容量。如果超过此数值，会引起喷嘴污染以及液体溅出等问题。

## (6) 样品的前处理及使用

根据 4~5 页的样品前处理方法来制备样品，并置于抽提架中。

- 使用带螺旋帽的 1.5ml 样品试管的情况下，请在打开试管盖的状态下放入指定位置。
- 使用普通的 1.5ml 试管时，请先用剪刀如下图进行剪断后再行安置。



- 根据在正面编有的 1~24 等号码的孔内，按顺序置放。

## (7) 抽提开始

按以下要领开始抽提。

- 确认样品，试管，专用试管（抽提 block 和回收 block），专用 Tip 等是否和说明书上的一致。
- 确认各试剂盒的使用位置，以及 stage 是否完全收回到内部，并请关闭机器前门。
- 确认在液晶画面上显示输入了正确的操作程序号码以及样品数。
- 出现“请按下开始键”的画面后，请确认无误后按下“START”键。
- 抽提操作开始后会在液晶画面上显示“操作中”。

## (8) 样品的回收

抽提操作结束后，打开机器前门取出样品。

- 抽提结束后，抽提的 DNA 被回收 block 上的试管回收。另外，液晶画面会再次显示“请按下开始键”字样的画面。
- 确认装置完全停止运行后，从回收 block 上取出试管，将其在低温（4~10℃）下保存，直至使用为止。
- 从磁珠中溶出 DNA 时使用的是 100 μl 溶出液（灭菌水），因此回收液量大约会是 100 μl。

## 6. 抽提后分析

### (1) DNA 的定量

DNA 溶液中的 DNA 量可通过测定 260nm 波长下的吸光度来定量。

- 测定吸光度的时候，请对 DNA 溶液进行离心分离（10,000rpm，1 分钟），然后使用上清液。
- $A_{260nm} / A_{280nm}$  比以及计算 DNA 浓度的时候，请务必将  $A_{320nm}$  值作为背景进行修正。

### (2) 电泳

取适量 DNA 溶液，加入市售或者自备的电泳用 Loading Dye 后，进行琼脂糖凝胶电泳。

- 请适当多加 Loading Dye，可定为正常使用量的 1.5 ~ 2 倍。电泳样品如果没有在凝胶内沉淀，则无法正常电泳。

### (3) PCR

DNA 溶液可作为 PCR 模板。

- DNA 溶液中可能会混入微量的磁珠，但不会影响 PCR 正常进行。
- DNA 溶液中混有 10% 左右的乙醇溶液，可能会对 PCR 反应有所阻碍，所以使用量请不要超过反应液的 1/5（反应液 50  $\mu$ l 时使用不超过 10  $\mu$ l）。

## [5] 疑难解答

抽提异常时，请参照以下对策。

### (1) 回收率低，无法得到 DNA

原因	对策
样品过剩	即使使用规定量以上的样品，也不会使回收量上升，反而会使效率下降。请调节样品量。
破碎·溶解不充分	(使用组织，鼠尾时) 可能是样品的前处理 (p4~5) 不够充分。使用①的前处理 (在溶解·吸附液中溶解) 时，请花时间 (5 分钟以上) 充分匀浆，直至看不到组织块。另外，福尔马林固定组织等一部分样品无法通过①的方法溶解。请尝试使用②的前处理 (使用 Proteinase K 溶解)。
	(使用革兰氏阳性菌时) 如果是革兰氏阳性菌等本试剂盒内附带的溶解·吸附液无法溶解的样品，就需要特别的溶解处理。例如，对于酵母，需要通过再次加入 Zymolyase 等溶解酶来溶解细胞壁。
试剂量不足	使用 MFX-2000 进行自动抽提时，请确认试剂是否足够，以及所有试剂的残存量。如果试剂残存量不多 (200 $\mu$ l 以下)，则认为液量不足。

· 另外，样品的种类以及保存状态的不同也会影响回收量 (收率)。

### (2) PCR 不能有效进行

原因	对策
回收液中混入的乙醇引起阻碍作用	DNA 溶液如果超过反应液的 1/5 就有可能对反应起阻碍作用。此时请减少液体量。 另外，将回收液在 75℃ 下加温 5 分钟左右，情况可以有所改善。
目标片段长度过长	抽提出的 DNA 的平均链长是 40kb 左右 (全血 DNA)，因此对于一般的 PCR 都没有问题，但是如果目标片段长度大于 5kb，由于 PCR 酶性能的原因，使得难以扩增。此时，推荐使用 KOD Dash (Code No: LDP-101) 等 Long Distance PCR 用酶。

· 其他关于 PCR 的疑难解答，请参考本公司的各种 PCR 用酶的实例集或者其他 PCR 相关说明书。

**(3) 洗净时磁珠不能完全分散，磁珠堵住了 Tip（使用 MFX-2000 进行自动抽提时）**

原因	对策
样品过剩	样品量如果过剩，磁珠就会容易凝集。另外，即使使用规定量以上的样品，回收量也不会上升，反而会降低效率。请减少样品量。
试剂量不足	请确认试剂是否足够，以及所有试剂的残存量。如果剩下不多（200 μl 以下），则可以认为液量已经不足了。如果洗净液不足或者搅拌不充分，磁珠就可能会不分散。

**(4) 磁珠不能很好地注入（使用 MFX-2000 进行自动抽提时）**

原因	对策
磁珠由于沉淀而固化	能够通过漩涡混合器混合直至均匀后再次用于抽提。在抽提之前，确认是否已经通过漩涡混合器混合均匀，并请在使用前（10 分钟以内）将磁珠放入 2ml 试管内。
由于蒸发使得磁珠混合液成分浓缩	为了防止以后的错误，请不要再使用 2ml 试管中残留的磁珠。另外，保存或者短时间放置的情况下，请将瓶子及试管等的盖子盖紧。

·其他关于机器操作的疑难解答，在 MFX-2000 的使用说明书中有记载，可以加以参考。

## [6] 参考文献

- 1) Vogelstein, B., and Gillespie, D., (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl.Acad.Sci.* 76:615-619.
- 2) Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheirm-van Dillen, P.M.E., and van der Noerdaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.Clin. Microbiol.* 28:495-503.





[制造 · 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 · 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：