

植物组织 DNA 高通量自动化提取—磁珠法

一、 样品前处理

- (1) 取新鲜植物样品 0.2 和或干燥植物样品 0.1 克，装入 1.5 ml 或 2 ml 的离心管中，同时加入 3~6 颗瓷珠，液氮冻透后，转移至冷冻研磨仪（MM400）高速匀浆 2~3 分钟。若需要得到完整的 DNA 分子，使用手工液氮研磨材料
- (2) 加 0.54 ml Buffer SPL 至样品管中，涡旋振荡 60 秒后 65℃水浴 15 分钟
- (3) 加 0.18 ml Buffer PS 至上述样品管中，涡旋振荡 60 秒后冰上放置 20 分钟
- (4) 室温下 4000~5000 g 离心 20 分钟
- (5) 取 400 μ l 上清液转移至 2 ml 96 深孔板中（以下利用自动化磁珠提取纯化系统提取 DNA）

二、 自动化磁珠提取纯化系统提取 DNA 程序编写

- (1) 双击桌面“VERSAware 10”图标，打开仪器控制软件，出现软件主界面
- (2) 点击“New Assay”新建运行程序，出现“VERSAware 10”对话框，给程序命名。默认名称为 Assay created on 日期+时间，也可按照实验者意愿进行命名。点击“OK”，在软件左侧以下顶端出现新建的程序名称
- (3) 鼠标选中新建的程序名称。首先设置试剂、样品、枪头放置的位置。一般 1 号工作盘位放置 TIP BOX（规格为 TIP BOX（8），200 μ l）。方法：鼠标选中右侧“TIP BOX”图标，出现各种规格的 Tips，选中该规格 Tip 的图标，按下左键不放，直接将其拖至 1 号工作盘位位置。2 号工作盘位放置 TIP BOX（规格 TIP BOX（8），1000 μ l），设置方法同前面。3 号工作盘位放置 Standard Plates（规格 96 PCR1，收集提取好的 DNA 样品），设置方法同前面。4 号工作盘位放置 Standard Plates（96 深孔板，规格 96 DEEP 1）。5 号工作盘位放置 Reservoir（试剂槽，共有 8 个槽放置不同类型和体积大小的试剂）。6 号工作盘位空置，提取 DNA 过程中 96 深孔板转移放置在该位置。

- (4) 点击“Advanced NAP”,在该界面下设置 Sample 和 Collection 位置。Sample 选择 4,表示 4 号工作盘位放置样品。Collection 选择位置 3,表示 3 号工作盘位放置 96 孔板收集提取好的 DNA 样品。同时设置反应孔,若提取 96 个样品,则 Sample4 和 Collection6 中所有孔全部选中,两个孔板选中孔的数量必须一一对应
- (5) 点击“New sequence”图标,添加实验步骤,出现对话框,在框中填写实验名称。第一步为添加磁珠,实验名称可填写为“add MagPure Particles”。在 Options 里面, Reagent Position 选择工作盘位 5。Tip Box for Reagent Addition 选择工作盘位 2。Tip Box for Waste Liquid Removal 选择工作盘位 1。Shaker # 1 Position 选择工作盘位 6。Shaker # 2 Position 选择工作盘位 6。Plate Cooler Position 选择工作盘位 6。Cooler temperature 手动填写冷却温度
- (6) 在 NAP Process 里面需要填写以下项目:Reagent Name 里面填写试剂名称, MagPure Particles, 旁边小方框勾选上“√”号; Reagent Source 选择 A5,表示试剂槽 A5 位置放置磁珠; Volume 手动填写数字 30; Well to Well 前的小方框勾选上“√”号
- (7) 点击“New sequence”,添加第 2 个实验流程,填写实验名称为 add GDP。主要步骤包括:向工作盘位 4 上的 96 深孔板的每个小孔中加注 400 μ l GDP 缓冲液 / 将深孔板从 4 号盘位转移至 6 号盘位 / 震动 6 号盘位混匀样品 / 将深孔板从 6 号盘位转移至 4 号盘位 / 深孔板静止放置 1 分钟,磁珠贴壁 / 弃上清液 850 μ l / 枪头不丢弃,使用后重新放回枪头盒,下一步实验重复使用
- (8) NAP Process 设置。Reagent Name 里面填写 add GDP,同时旁边小方框勾选上“√”号。Reagent Source 选择 A6,表示试剂槽 A6 位置放置 GDP 缓冲液。Volume 手动填写数字 400; Well to Well 前的小方框勾选上“√”号。Move Plate 勾选后出现对话框,Source Plate 填写 4,Target Plate 填写 6,点击“OK”即可。Shaker 2 勾选上以后出现对话框,填写震动速率、时间和震动模式,点击“OK”即可。Move Plate 勾选后出现对话框,Source Plate 填写 6,Target Plate 填写 4,点击“OK”即可。选择 Magnet,填写

数字 1，表示静止 1 分钟使磁珠贴壁。选择 Waste，弃上清液，在框中手动填写 850。Reuse Tips 勾选上。设置完成，点击界面上端“保存”图标，保存设置的程序

- (9) 点击“New sequence”，添加第 3 个实验流程，填写实验名称为 add GW2。主要步骤包括：向工作盘位 4 上的 96 深孔板的每个小孔中加注 600 μ l GW2 / 将深孔板从 4 号盘位转移至 6 号盘位 / 震动 6 号盘位混匀样品 / 将深孔板从 6 号盘位转移至 4 号盘位 / 深孔板静止放置 1 分钟，磁珠贴壁 / 弃上清液 600 μ l / 枪头不丢弃，使用后重新放回枪头盒，下一步实验重复使用
- (10) NAP Process 设置。Reagent Name 里面填写 add GW2，同时旁边小方框勾选上“ \checkmark ”号。Reagent Source 选择 A7，表示试剂槽 A7 位置放置 GW2。Volume 手动填写数字 600；Well to Well 前的小方框勾选上“ \checkmark ”号。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 4，Target Plate 填写 6，点击“OK”即可。Shaker 2 勾选上以后出现对话框，填写震动速率、时间和震动模式，点击“OK”即可。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 6，Target Plate 填写 4，点击“OK”即可。选择 Magnet，填写数字 1，表示静止 1 分钟使磁珠贴壁。选择 Waste，弃上清液，在框中手动填写 600。Reuse Tips 勾选上。设置完成，点击界面上端“保存”图标，保存设置的程序
- (11) 点击“New sequence”，添加第 4 个实验流程，填写实验名称为 add GW2。主要步骤包括：向工作盘位 4 上的 96 深孔板的每个小孔中加注 600 μ l GW2 / 将深孔板从 4 号盘位转移至 6 号盘位 / 震动 6 号盘位混匀样品 / 将深孔板从 6 号盘位转移至 4 号盘位 / 深孔板静止放置 1 分钟，磁珠贴壁 / 弃上清液 650 μ l / 枪头不丢弃，使用后重新放回枪头盒，下一步实验重复使用
- (12) NAP Process 设置。Reagent Name 里面填写 add GW2，同时旁边小方框勾选上“ \checkmark ”号。Reagent Source 选择 A8，表示试剂槽 A8 位置放置 GW2。Volume 手动填写数字 600；Well to Well 前的小方框勾选上“ \checkmark ”号。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 4，Target Plate 填写 6，点击“OK”

即可。Shaker 2 勾选上以后出现对话框，填写震动速率、时间和震动模式，点击“OK”即可。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 6，Target Plate 填写 4，点击“OK”即可。选择 Magnet，填写数字 1，表示静止 1 分钟使磁珠贴壁。选择 Waste，弃上清液，在框中手动填写 650。Reuse Tips 勾选上。设置完成，点击界面上端“保存”图标，保存设置的程序

- (13) 点击“New sequence”，添加第 5 个实验流程，填写实验名称为 add Elution。主要步骤包括：向工作盘位 4 上的 96 深孔板的每个小孔中加注 100 μ l Elution / 加热工作盘位 6 适配器至 60 $^{\circ}$ C / 将深孔板从 4 号盘位转移至 6 号盘位 / 震动 6 号盘位混匀样品 / 将深孔板从 6 号盘位转移至 4 号盘位 / 深孔板静止放置 2 分钟，磁珠贴壁。其它参数设置为零或不用勾选上
- (14) NAP Process 设置。Reagent Name 里面填写 add Elution，同时旁边小方框勾选上“ \checkmark ”号。Reagent Source 选择 A2，表示试剂槽 A2 位置放置 Elution。Volume 手动填写数字 100；Well to Well 前的小方框勾选上“ \checkmark ”号。选中 Heater，出现对话框，填写温度值。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 4，Target Plate 填写 6，点击“OK”即可。Shaker 2 勾选上以后出现对话框，填写震动速率、时间和震动模式，点击“OK”即可。Move Plate 勾选后出现对话框，Source Plate 填写 6，Target Plate 填写 4，点击“OK”即可。选择 Magnet，填写数字 2，表示静止 2 分钟使磁珠贴壁。
- (15) 点击“New sequence”，添加第 6 个实验流程，填写实验名称为 Transfer。主要步骤包括：将 4 号工作盘位 96 深孔板中的 DNA 样品转移至 3 号工作盘位上的 96 孔板中
- (16) NAP Process 设置。Reagent Name 里面填写 Transfer，同时旁边小方框勾选上“ \checkmark ”号。Well to Well 前的小方框勾选上“ \checkmark ”号。Elution 填写数字 90。其它参数设置为零或不用勾选上
- (17) 点击软件主界面上端“Save”按钮，保存所编辑的程序

三、 DNA 自动化提取

- ① 枪头、试剂、样品及 96 孔板的放置。1 号盘位放置带过滤膜的 200 μ l 枪头。

2 号盘位放置带过滤膜的 1000 μ l 枪头。3 号盘位放置 96 孔、200 μ l 的 PCR 孔板。4 号盘位放置 96 深孔板（带液体样品）。5 号盘位放置试剂槽，共 8 个槽位，每个槽位放置的试剂类型依据程序设定放置。6 号盘位空置，不用放任何孔板

- ② 先开仪器，再开显示器和电脑主机，待仪器稳定后，双击桌面“VERSAware 10”软件图标，直接点击确定，即可进入软件主界面
- ③ 在软件界面左侧，鼠标选中需要运行的程序名称，点击“Run”图标，及其开始自动提取 96 深孔板中的样品 DNA