

HiPure Circulating DNA Midi Kit C

游离 DNA 中提试剂盒（抽滤型，5ml）

HiPure Circulating DNA Kits 为血清、血浆和其它无细胞液体样品的循环 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。循环 DNA 是指游离在细胞外的 DNA，它是细胞凋亡产生的。循环 DNA 片段一般在 1KB 以下。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，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。循环 DNA 可直接用于定量 PCR，液相或固相芯片分析，杂交和 SNP 检测等分析。HiPure Circulating DNA Midi Kit A 适合于从 5ml 血浆中捕获极微量的游离核酸。

产品组份

产品编号	D3182-01C	D3182-02C	D3182-03C
纯化次数	4 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer ACL	20 ml	60 ml	250 ml
Buffer ACB2*	30 ml	60 ml	300 ml
Buffer DCW1*	6.6 ml	6.6 ml	22 ml
Buffer DCW2*	6 ml	6 ml	20 ml
Proteinase K	60 mg	120 mg	540 mg
Protease Dissolve Buffer	5 ml	15 ml	30 ml
Carrier RNA	120 µg	120 µg	120 µg
Nuclease Free Water	10 ml	10 ml	10 ml
HiPure CFDNA Mini Columns	4	10	50
2ml Collection Tube	4	10	50
Extender Tubes	4	10	50
Vac-Connectors	4	10	50

保存条件

HiPure Circulating DNA Kits 除 Proteinase K 和 Carrier RNA 外,可在室温下(15~25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2~8°C。Proteinase K 和 Carrier RNA 干粉室温运输,收到试剂盒后请保存于 2~8°C 或 -20°C。

准备事项

- 60°C 水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至装有 Proteinase K 的瓶子中,至终浓度为 20mg/ml。轻轻颠倒让 Proteinase K 干粉充分溶解。溶解后 Proteinase K 须保存于 -20°C。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- 溶解 Carrier RNA (0.2µg/µl): 加入适量的 Nuclease Free Water 至装有 Carrier RNA 干粉管至终浓度为 0.2µg/µl。涡旋混匀让 Carrier RNA 干粉充分溶解。溶解后分装保存于 -20°C。溶解后的 Carrier RNA 反复冻融次数不要超过 3 次。当样品中核酸非常低的时候,Carrier RNA 可提高微量核酸回收效率。
- 按瓶子标签所示,加入无水乙醇稀释 Buffer DCW2,并于室温保存。
- 按瓶子标签所示,加入无水乙醇稀释 Buffer DCW1,并于室温保存。
- 按瓶子标签所示,加入异丙醇稀释 Buffer ACB,并于室温保存。

血浆或血清或体液的分离与保存

1. 取 EDTA 抗凝血液、积液或分泌液等样品,4°C,1900 x g (3000 rpm) 离心 10 分钟去除体细胞,小心吸取血浆或体液至高速离心管中。
一般 10 毫升的血液中可以获得约 4-5 毫升的血浆。
2. 4°C,16,000 x g 离心 10 分钟,清除细胞碎片和附着在细胞碎片上的额外细胞核酸,以及来自受损血细胞的 gDNA 和 RNA。
3. 小心将上清液移到新的离心管中,不要吸到沉淀。
如果当天使用时,2-8°C 保存待用。长期保存时,-80°C 保存。冻存血浆或血清或体液样品,使用前先在室温下解冻。若解冻后样品中有沉淀物产物,4°C,16,000 x g 离心 5 分钟后,小心转移上清液至新的离心管中。

实验步骤

1. 在 50ml 离心管中，加入 0.5ml Proteinase K 和 5.0ml 血清、血浆或体液，颠倒 3 次。
2. 加入 4.0 ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 μ g)至样品中，颠倒混匀 6-8 次，涡旋混匀 15 秒。
使用前，Carrier RNA 与 Buffer ACL 预先混匀，每个样品中 Carrier RNA 的用量为 1 μ g (5 μ l)，Carrier RNA 有利于提高 DNA 的回收率，但会影响 qubit 定量。可根据实验要求，选择加入或不加入。
这一步要达到明显的涡旋效果，以确保充分混匀样品。
3. 60 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒数次混匀。
4. 加入 9.5ml Buffer ACB2，颠倒混匀 6-8 次，涡旋混匀 15 秒，冰上放置 5 分钟。
Buffer ACB2 使用前，须按瓶子标签或说明书指示，加入适量的异丙醇进行稀释，并于室温保存。
这一步要达到明显的涡旋效果，以确保充分混匀样品。
5. 把 HiPure CFDNA Mini Column 插到 Vac-Connectors 中，然后再插到真空抽滤盒接口处。
6. 把 Extender Tubes 插到 HiPure CFDNA Mini Column 中。
7. 转移部分混合液（第四步）至 Extender Tubes 中，打开真空泵进行抽滤，继续把混合液转移至柱子进行抽滤（柱子未干之前加入），当液体全部过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降为零。
这一步需要 30-40 分钟才能让全部滤液过滤完毕。
8. 加入 900 μ l Buffer DCW1 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当全部溶液过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降至零。
9. 加入 900 μ l Buffer DCW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当全部溶液过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降至零。
10. 取下 Extender Tubes 并弃去，加入 800 μ l 无水乙醇至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当全部溶液过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降至零。
11. 取下柱子装回 2ml 收集管中，13,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 取出柱子，装在 1.5ml 新的收集管中，放置于 56 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 10 分钟。

13. 加入 50~60 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央，放置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- 样品保存不当：血液样品发生溶血，减少样品用量。
- 样品杂质过多：于 16,000 \times g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。
- Proteinase K 活性下降：重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于-20 $^{\circ}$ C。Proteinase K 与 Buffer ACL 不能预先混合。
- 样品裂解不充分：样品与 Buffer ACL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer ACL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer ACL 充分混匀。

2. DNA 纯度不达标

- 柱子需要充分 56 $^{\circ}$ C 干燥：彻底干燥去除乙醇，对下游酶促反应很关键。
- 样品杂质过多：于 16,000 \times g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。