

## HiPure Circulating DNA Midi Kit D2

游离 DNA 中提试剂盒 (离心型, 10ml)

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 片断一般在 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 D2 适合于从 10ml 血浆中捕获极微量的游离核酸。

### 产品成份

产品编号	D3182-01D2	D3182-02D2	D3182-03D2
纯化次数	4 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer ACL	40 ml	100 ml	450 ml
Buffer ACB*	60 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer DCW1*	6.6 ml	6.6 ml	22 ml
Buffer DCW2*	6 ml	6 ml	10 ml
Proteinase K	120 mg	240 mg	2 x 540 mg
Protease Dissolve Buffer	10 ml	15 ml	2 x 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	8	20	100
Extender Tubes	4	10	50
Support Tubes	4	10	50
50ml Centrifuge Tubes	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 1.0ml Proteinase K 和 10ml 血清、血浆或体液，颠倒 3~5 次。
2. 加入 8.0 ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 $\mu$ g)至样品中，颠倒混匀 6-8 次，涡旋混匀 20 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 $\mu$ g (5 $\mu$ 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. 55°C水浴 60 分钟，其间每隔 10-15 分钟颠倒混匀 3-5 次。
4. 加入 19ml Buffer ACB 至样品中，颠倒混匀 20-30 次，冰上放置 10 分钟。

Buffer ACB 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。
5. 把 Extender Tubes 插到 HiPure CFDNA Mini Column 中，然后再 Column 插到 Support Tube 中，把三个连接好的组件一起放到 50ml Centrifuge Tube 中。

为防止柱子从 Extender Tubes 和 CFDNA 柱子的侧壁流出，把 Extender Tubes 用力插到柱子中，不要使用其它 50ml 离心管。当 Extender Tube, CFDNA Column 和 Support Tubes 放到 50ml 离心管中后，有 2-3mm 突出，第 6 步盖上盖子，用力下压并旋紧盖子。
6. 转移 13ml 混合液（第 4 步）至 Extender Tubes 中，用力压紧盖子并旋紧盖子，3,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
7. 打开离心管的盖子，小心取出柱子，倒弃滤液，把整套装置装回离心管。
8. 转移 13ml 混合液至 Extender Tubes 中，用力压紧盖子并旋紧盖子，3,000  $\times$  g 离心 5 分钟。

重复这一步直至全部混合液都转移至柱子中并离心。
9. 打开离心管的盖子，小心取出柱子，倒弃 Extender Tube、Support Tube 和 50ml 离心管。
10. 把 HiPure CFDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，13,000  $\times$  g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ l Buffer DCW1 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 60 秒。

Buffer DCW1 使用前，按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇进行稀释，于室温保存。
12. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ l Buffer DCW2，13,000  $\times$  g 离心 60 秒。

Buffer DCW2 使用前，按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇进行稀释，于室温保存。

13. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ l 无水乙醇。13,000  $\times$  g 离心 60 秒。
14. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
15. 取出柱子，装在 1.5ml 新的收集管中，放置于 56°C 烘箱中干燥 10 分钟。
16. 加入 60 $\mu$ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央，放置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
17. 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。
18. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C 或-80°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°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°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。