

HiPure Circulating DNA Mini Kit

游离 DNA 小提试剂盒 (1.0ml)

HiPure Circulating DNA Mini Kit 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。得到的循环 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 Micro Kit 适合于从 1ml 血浆中捕获极微量的游离核酸。

产品组份

产品编号	D3181-01	D3181-02	D3181-03
纯化次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer ACL	12 ml	50 ml	250 ml
Buffer DCW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer DCW2 *	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	30 ml
Carrier RNA	120 µg	120 µg	310 µg
Proteinase K	24 mg	120 mg	5 x 120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure Viral Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tube	20	100	5 x 100
说明书	1	1	1

保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K/Carrier RNA 干粉室温运输和保存，收到产品后，建议保存于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K/Carrier RNA 需保存于-20~8℃。

准备事项

- 无水乙醇(96~100%)
- 60℃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℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- 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。
- 溶解 Carrier RNA (0.2μg/μl): 按下表加入适量的试剂至装有 Carrier RNA 干粉管至终浓度为 0.2μg/μl。涡旋混匀，室温放置 10 分钟让 Carrier RNA 干粉充分溶解。溶解后分装保存于-20℃。

产品编号	D3181-01	D3181-02	D3181-03
Carrier RNA	120 μg	120 μg	310 μg
Elution Buffer	500 μl	500 μl	1.4 ml
Proteinase K	5 μl	5 μl	20 μl

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℃，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 × 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 × 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. 转移 100µl Proteinase K 至 5.0ml 离心管中, 然后加入 1.0 ml 血浆、血清、尿液、积液或其它无细胞体液样品, 颠倒混匀 3-5 次。
2. 加入 1.0 ml Buffer ACL 和(可选)5µl Carrier RNA 至样品中, 颠倒混匀 15~20 次。
使用前, Carrier RNA 与 Buffer ACL 预先混匀, 每个样品中 Carrier RNA 的用量为 1µg (5µl), 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。
3. 60°C 水浴 30~60 分钟, 其间每隔 10-15 分钟颠倒数次。
4. 加入 0.7ml 异丙醇至样品中, 颠倒混匀 3-5 次, 涡旋 10~15 秒, 冰上放置 3~5 分钟。
5. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中, 转移 750µl 混合液至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中, 继续转移 750µl 混合液至柱子。10,000 × g 离心 1 分钟。重复此步直至所有混合液都转移至柱子中并离心。
7. 把柱子装在新的收集管中。加入 500µl Buffer DCW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000 × g 离心 1 分钟。
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。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
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。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。

10,000 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中，56°C 进一步干燥柱子 10 分钟。
12. 加入 40~50µl Elution Buffer 至柱子的膜中央，放置 2 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。
13. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，放置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8°C，长期保存需保存于-20°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 × 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 × g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。