

HiPure Circulating DNA Midi Kit G

游离 DNA 中提抽滤试剂盒 (10ml)

HiPure Circulating DNA Kits G 为尿液、腹水等低蛋白质含量样品的循环 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 Midi Kit G 适合于从 10ml 尿液中捕获极微量的游离核酸。

产品组份

产品编号	D3182-01G	D3182-02G	D3182-03G
纯化次数	4 Preps	20 Preps	50 Preps
Buffer ACL	40 ml	250 ml	500 ml
Buffer ACB2*	60 ml	300 ml	2 x 300 ml
Buffer DCW1*	6.6 ml	22 ml	22 ml
Buffer DCW2*	6 ml	10ml	10 ml
Proteinase K	48mg	220 mg	560 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	20	50
2ml Collection Tube	4	20	50
Extender Tubes	4	20	50
Vac-Connectors	4	20	50

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℃。

准备事项

- 无水乙醇(96~100%)
- 异丙醇
- 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。
- 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℃。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 ACB2，并于室温保存。

实验步骤 (实例 10ml)

1. 转移 500µl Proteinase K 至 50ml 离心管中。
2. 转移 10ml 血清、血浆或其它液体样品至装有 Proteinase K 离心管中，混匀 5 秒。
3. 加入 8ml Buffer ACL/Carrier RNA(1µg)至样品中，涡旋混匀 15 秒。60℃水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒数次混匀。

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)。

4. **加入 18ml Buffer ACB2 至样品中。**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。
5. 把 HiPure CFDNA Mini Column 和 Vac-Connectors 连接到真空抽滤盒中。
6. 把 Extender Tubes 插到柱子中。
7. **把第四步获得的混合液转移至柱子中并打开真空泵进行抽滤，继续把混合液转移至柱子进行抽滤，直到把所有混合液都转移至柱子中并抽滤完毕。**关闭真空泵，让压力下降为零。
8. 从抽滤器上取下柱子。把柱子装回收集管中。**加入 600 μ 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。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer DCW2 至柱子中。**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。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l 无水乙醇至柱子中。**13,000 \times g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 取出柱子，装在 1.5ml 新的收集管中，然后放置于 56 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 10 分钟。
13. **加入 50~60 μ l Nuclease Free Water 或 Buffer TE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。
 \geq 13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. **把洗脱液转移至柱子的膜中央。**放置 1 分钟。 \geq 13,000 \times g 离心 1 分钟。
这一步推荐使用 Buffer TE 来洗脱 DNA。使用 Buffer TE 洗脱，有利于 DNA 的保存。由于 Buffer TE 在 230nm 有吸光度，使用 Buffer TE 洗脱时，得到出 OD260/OD230 会有较大的偏大，但不会影响下游应用。
15. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

快速方案：

1. 转移 500 μ l Proteinase K 至 50ml 离心管中。
2. 转移 10ml 血清、血浆或其它液体样品至装有 Proteinase K 离心管中，混匀 5 秒。
3. 加入 10ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 μ g)至样品中，涡旋混匀 15 秒。60 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒数次混匀。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)。
4. 加入 10ml 无水乙醇至样品中。涡旋混匀 15 秒，冰上放置 5 分钟。
5. 按 5-15 步进行操作。

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 x 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 x g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。