

## HiPure Circulating DNA Midi Kit D

游离 DNA 中提离心法试剂盒 (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 D 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	D3182-01D	D3182-02D	D3182-03D
纯化次数	4 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer ACL	20 ml	60 ml	220 ml
Buffer ACB*	30 ml	60 ml	300 ml
Buffer DCW1 *	6.6 ml	6.6 ml	22 ml
Buffer DCW2 *	6 ml	6 ml	10 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	8	20	100
Extender Tubes	4	10	50
Support Tubes	4	10	50
50ml Centrifuge Tubes	4	10	50
Sealing Ring	4	10	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 ACB，并于室温保存。

## 实验步骤 (实例 5ml)

1. 转移 500 $\mu$ l Proteinase K 至 50ml 离心管中。
2. **转移 5ml 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 4ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 $\mu$ 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 $\mu$ g (5 $\mu$ l)。
4. **加入 9ml Buffer ACB 至样品中。**涡旋混匀 15 秒。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。
6. **转移一半体积的混合液至 Extender Tubes 中，盖上盖子。**2000  $\times$  g 离心 5 分钟。
7. **倒弃滤液，再余下的混合液转到 Extender Tubes 中，盖上盖子。**2000  $\times$  g 离心 5 分钟。
8. 打开离心管的盖子，取出柱子，弃去 50ml 离心管、Support Tubes 和 Extender Tube。
9. 把 HiPure CFDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**加入 600 $\mu$ 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。
10. 倒弃滤液，把柱子装在新的收集管中。**加入 600 $\mu$ 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。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l 无水乙醇至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
13. 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。
14. **加入 50~60 $\mu$ 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。

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. **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。
16. 丢弃 DNA 结合柱,把 DNA 保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

## 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 $-20^{\circ}\text{C}$ 。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  $56^{\circ}\text{C}$  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。