

## HiPure Circulating DNA Mini Kit G

游离 DNA 中提试剂盒（尿液，15ml）

HiPure Circulating DNA Kits G 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。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。

### 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	60 ml	350 ml	2 x 400 ml
Buffer ACB2*	60 ml	300 ml	2 x 300 ml
Buffer DCW1*	6.6 ml	22 ml	22 ml
Buffer DCW2*	6 ml	10 ml	20 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
Support Tube	4	20	50
50ml Centrifuge Tubes	4	20	50

### 保存条件

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

## 准备事项

- 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 ACB2, 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、积液或分泌物等样品, 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 (离心方案)

1. 在 50ml 离心管中, 加入 0.5ml Proteinase K 和 10ml 血清, 血浆, 尿液, 颠倒 3~5 次。
2. 加入 8.0 ml Buffer ACL/Carrier RNA(1µg)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 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。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 18ml Buffer ACB2 至样品中，颠倒混匀 15-30 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 步盖上盖子时，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 × 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 混和液至 Extender Tubes 中，用力压紧盖子并旋紧盖子，3,000 × 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. 把 HiPure CFDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，13,000 × g 离心 60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700µl Buffer DCW1 至柱子中。13,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700µl Buffer DCW2，13,000 × g 离心 60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700µl 无水乙醇。13,000 × g 离心 60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 3 分钟。
14. 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。
15. 加入 60µl Elution Buffer 至柱子的膜中央，放置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。
16. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 -20°C 或 -80°C。

## 实验步骤 (抽滤方案)

1. 在 50ml 离心管中，加入 0.5ml Proteinase K 和 15ml 尿液，颠倒 3~5 次。
2. 加入 15ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 $\mu$ g)至样品中，颠倒混匀 10-15 次。
3. 55 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟，其间每隔 10-15 分钟，颠倒混匀 3-5 次让样品消化。  
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。
4. 加入 8ml 异丙醇至样品中，颠倒混匀 20-30 次，冰上放置 10 分钟。
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 3 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 50~60 分钟才能让全部滤液过滤完毕。
8. 加入 900 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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. 取下柱子装入 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 $\mu$ 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。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。