

HiPure Circulating DNA Micro Kit

游离 DNA 小提试剂盒 (0.6ml)

HiPure Circulating DNA Micro 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 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 0.6ml 血浆中捕获极微量的游离核酸。

产品组份

产品编号	D3180-01	D3180-02	D3180-03
纯化次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer ACL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer DCW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer DCW2 *	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer AE	10 ml	10 ml	30 ml
Carrier RNA	120 µg	120 µg	310 µg
Proteinase K	12 mg	36 mg	180 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 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%)
- 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。
- 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	D3180-01	D3180-02	D3180-03
Carrier RNA	120 µg	120 µg	310 µg
Buffer AE	550 µl	550 µl	1.55 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°C，1900 × 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. 在 2.0ml 离心管中，加入 30µl Proteinase K 和 0.6ml 血浆、血清、积液或其它液体样品，颠倒混匀 3 次。
2. 加入 0.6ml Buffer ACL 和(可选)5µl Carrier RNA 至样品中，涡旋混匀 10 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。
3. 60°C 水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒数次混匀。
4. 加入 0.3ml 异丙醇至样品中，涡旋混匀 10 秒，室温放置 5 分钟。
5. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟。弃去滤液和收集管。
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。13,000 × g 离心 1 分钟。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DCW2(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。60 $^{\circ}$ C 进一步干燥柱子 10 分钟。
12. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~50 μ l Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。放置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 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。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 \times g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。