

## HiPure Circulating DNA Midi Kit D

游离 DNA 中提试剂盒（离心型，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。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	20 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

## 保存条件

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

## 准备事项

- 60°C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°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 ACB，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、分泌液或尿液等样品，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 50ml 离心管中，加入 0.5ml Proteinase K 和 5.0ml 血清、血浆或体液，颠倒 3~5 次。
2. 加入 4.0 ml Buffer ACL/Carrier RNA(1 $\mu$ g)至样品中，颠倒混匀 3-5 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 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。
3. 60°C水浴 30 分钟，其间偶尔颠倒数次混匀。
4. 加入 9.5ml Buffer ACB，颠倒混匀 6-8 次，涡旋混匀 10 秒，冰上放置 5 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。这一步要达到明显的涡旋效果，以确保充分混匀样品。
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，用力下压并旋紧盖子。
6. 转移一半体积的混合液(第 4 步)至 Extender Tubes 中，用力压紧盖子并旋紧盖子，3,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
7. 小心取出 Extender Tubes/CFDNA 柱子/Support Tubes，倒弃滤液，再把整套柱子装回收集管中。
8. 把余下的混合液转移至 Extender Tubes 中，用力压紧盖子并旋紧盖子，盖上盖子，3,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
9. 打开离心管的盖子，小心取出柱子，倒弃 Extender Tube、Support Tube 和 50ml 离心管。
10. 把 HiPure CFDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，13,000  $\times$  g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ 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。

12. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ l Buffer DCW2，13,000  $\times$  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。
13. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 700 $\mu$ l 无水乙醇。13,000  $\times$  g 离心 60 秒。
14. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
15. 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。
16. 加入 50 $\mu$ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央，放置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
17. 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。
18. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C 或-80°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°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  $\times$  g 离心 10 分钟，去除样品中多余的杂质。