

【产品名称】

通用名：核酸提取或纯化试剂

产品编号：IVD3182

【包装规格】

50 份/盒

【预期用途】

本产品为血清、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 C 适合于从 5ml 血浆中捕获极微量的游离核酸。

【检验原理】

本产品基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液(Buffer ACL)和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入 Buffer ACB 后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随溶液滤出。柱子经 Buffer DCW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer DCW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、病毒检测等实验。

【样本要求】

1. 样本的采集、运输及保存符合相关操作规范。
2. 血液样品需从枸橼酸钠或 EDTA 抗凝血从采血时开始计算时间，在 2-8°C 条件下可保存 5 天。抗凝血液、血浆、血清在-20°C 条件下保存 1 个月以上。避免反复冻融。处理凝固血液时，需用匀浆器进行充分匀浆，充分液化后再操作。

【试剂盒组份】

产品编号	MD3182
纯化次数	50 Preps
Buffer ACL	220 ml
Buffer ACB2	300 ml
Buffer DCW1 *	22 ml
Buffer DCW2 *	10 ml
Proteinase K	540 mg
Protease Dissolve Buffer	30 ml
Carrier RNA	120 µg
Nuclease Free Water	10 ml
HiPure CFDNA Mini Columns	50
2ml Collection Tube	50
Extender Tubes	50
Vac-Connectors	50

【储存条件及有效期】

本产品其它组份可在室温(15~25°C)保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8°C。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55°C 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K/Carrier RNA 干粉室温运输和保存，超过 6 个月时，建议把 Proteinase K/Carrier RNA 保存于-20°C。

【准备工作】

- 无水乙醇(96~100%)
- 异丙醇
- 60℃水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 27ml 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-20~8℃。
- 溶解 Carrier RNA (0.2 μ g/ μ l): 加入适量的 Nuclease Free Water 至装有 Carrier RNA 干粉管至终浓度为 0.2 μ g/ μ l。涡旋混匀让 Carrier RNA 干粉充分溶解。溶解后分装保存于-20-80℃。溶解后的 Carrier RNA 反复冻融次数不要超过 3 次。
- 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。
- 处理 1~4ml 血浆样品时, 按比例调整 Proteinase K, Buffer ACL 和 Buffer ACB2 的用量。

实验步骤 (实例 5ml)

1. 转移 500 μ 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 μ g)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 1 μ g (5 μ l)。
4. **加入 9ml 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℃ 烘箱中干燥 10 分钟。
13. **加入 50~70 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℃或-80℃。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本说明书。
3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险, 检测样品应视为具有传染性物质, 避免接触到皮肤和粘膜。标本操作和处理均需符合相关法规要求: 卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
4. 所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器, 并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。