

版本号:191112

## Circulating Nucleic Acid Mini Kit

### 少量游离循环核酸提取试剂盒

目录号: DN47

#### ❖ 适用范围:

适用于从人血浆、血清、尿液或者其它无细胞体液中提取游离循环DNA/RNA和病毒核酸DNA/RNA。

#### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次(DN4701)
Buffer ACL	室温	40 ml
Buffer ACB	室温	60 ml 第一次使用前按说明加指定量异丙醇
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	5 ml
蛋白酶 K 溶液 20mg/ml	4℃或者室温	5 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照指示温度储存 12 个月不影响使用效果。

#### 储存事项:

1. 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
2. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过 20℃室温至少保存 6 个月，4℃保存 12 个月，-20℃保存 2 年。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## ❖ 产品介绍：

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻（冰冻后没有解冻过，冻融会影响质量）的血清、血浆、尿液等无细胞体液中提取游离循环核酸 DNA/RNA。本试剂盒针对游离循环核酸片段小，含量低的特点研发了独特的缓冲液系统，确保高效提取游离核酸。纯化的游离核酸产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制物。本品可以处理 0.1-1 ml 的液体样本，配置的高效微量吸附柱洗脱体积可低至 20  $\mu$ l。游离核酸含量极低（典型浓度 1-100ng/ml 血浆），得率与样品的类型，储存条件、时间以及个体间差异有很大关系。纯化得到的游离 DNA 质量稳定、可靠，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 和二代测序等分子生物学实验。

## ❖ 产品特点：

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 30-50 分钟内完成。
3. 纯化的游离核酸产量高、质量好，用于下游实验表现更佳。

## ❖ 注意事项

1. 样品冰冻保存后直到提取前应避免解冻，如果确实无法避免，应避免多次冻融，否则会导致提取量下降。
2. 建议处理前 4 $^{\circ}$ C 以 16,000g 离心 5-10 分钟，可以进一步去除细胞碎片，减少来自于受损血细胞的 gDNA 和 RNA 的污染。冰冻后如果出现微小蛋白沉淀的情况下，也建议 4 $^{\circ}$ C 以 16,000g 离心 5 分钟。
3. 需要自备乙醇，异丙醇。实验开始前请将水浴锅预热至 60 $^{\circ}$ C。
4. 本试剂盒可以提取 0.1-1 ml 液体样品。
5. 如果处理样品为尿液，需要联系我们，单独订购 Buffer ATL。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

**提示：**

⇒ 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先 在去蛋白液 PE 瓶、漂洗液 RW 瓶加入乙醇，Buffer ACB 瓶加入**异丙醇**，混合均匀，并在试剂瓶标签上做好标记。

1. 向 1.5ml 离心管中加入 20  $\mu$ l Proteinase K。（起始处理量超过 300 $\mu$ l 体积的样本，需选择更大容积的适合离心管）
2. 加入 200  $\mu$ l 血清/血浆样本。

**注意：当样品量超过 200  $\mu$ l 时，请按比例增加 Proteinase K、Buffer ACL 和 Buffer ACB 试剂用量，具体试剂加入量可参考最后的附表。**

3. 加入 160  $\mu$ l Buffer ACL，混匀，涡旋震荡至少 30 秒。
4. 60 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，其间颠倒混匀数次。

**注意：200  $\mu$ l 血清/血浆样本 60 $^{\circ}$ C 孵育 10-15 分钟即可。**

5. 加入 360  $\mu$ l Buffer CB（使用前检查是否加入**异丙醇**），涡旋震荡 15-30 秒混匀。
6. 冰浴 5 分钟，短暂离心，使管壁和壁盖上的液体集中到管底。
7. 立刻将混合物(每次小于 750 $\mu$ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。
8. 加 500  $\mu$ l 去蛋白液 RE，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 加入 750  $\mu$ l 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
10. 加入 750  $\mu$ l 无水乙醇，13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
11. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去乙醇，以免残留乙醇抑制下游反应。
12. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，在吸附膜的中间部位加 20-50 $\mu$ l RNase free water（事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量），室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟。-20 $^{\circ}$ C 保存洗脱的 RNA/DNA。

**如果要提高核酸 RNA/DNA 的终浓度，可以将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟。**

**如果提取的游离 DNA，可以用灭菌 TE 缓冲液洗脱，对于长期保存，效果更好。**

附表：不同血浆/血清样品量推荐试剂加入量

样本体积 试剂加入量	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l	600 $\mu$ l	800 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Buffer ACL	160 $\mu$ l	240 $\mu$ l	480 $\mu$ l	640 $\mu$ l	800 $\mu$ l
Buffer ACB	360 $\mu$ l	540 $\mu$ l	1080 $\mu$ l	1440 $\mu$ l	1800 $\mu$ l
Proteinase K	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	60 $\mu$ l	80 $\mu$ l	100 $\mu$ l

### 附录：从尿液样品中提取游离循环核酸

1. 向 5ml 离心管中加入 63  $\mu$ l Proteinase K。

2. 加入 500  $\mu$ l 尿液样本。

**注意：当样品量超过 500  $\mu$ l 时，请按比例增加 Proteinase K、Buffer ACL 和 Buffer ACB 试剂用量。**

3. 加入 500  $\mu$ l Buffer ACL 和 125  $\mu$ l Buffer ATL，混匀，涡旋震荡混匀至少 30 秒。

**注意：Buffer ATL 最后加入，确保充分涡旋混匀。混匀时可能有沉淀产生，为正常现象，后续加热步骤会溶解，不影响产量。**

4. 60 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，其间颠倒混匀数次。

5. 加入 1.8 ml Buffer CB（使用前检查是否加入**异丙醇**），涡旋震荡 15-30 秒混匀。

6. 冰浴 5 分钟，短暂离心，使管壁和壁盖上的液体集中到管底。

7. 接操作步骤 7。