



CWhipro Circulating Nucleic Acid Kit

游离核酸提取试剂盒

目录号：CW2603S (50 preps)

保存条件：Spin Column DF 2-8°C保存1年，其他组分室温（15-30°C）。

产品内容

Component	CW2603S 50 preps
Buffer CL	45 ml
Buffer CB (concentrate)	60 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer EBL	10 ml
Proteinase K	100 mg
Proteinase K Storage Buffer	5 ml
Spin Columns DF with Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻的血清、血浆、淋巴液等无细胞体液中提取游离DNA。本试剂盒采用可以特异性结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，样品裂解后，游离DNA在高盐条件下与硅胶膜结合，在低盐、高pH值时游离DNA从硅胶膜上洗脱下来。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 μ l。纯化的DNA产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制物，游离DNA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。

自备试剂：无水乙醇、异丙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入5 ml的Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取量下降。
3. 本试剂盒可以提取0.1-1 ml液体样品。
4. 使用前请检查Buffer CL、Buffer CB是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer CL、Buffer CB于56℃水浴孵育重新溶解。
5. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer CB中加入异丙醇，混合均匀，并在试剂瓶标签上做好标记。
6. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇，混合均匀，并在试剂瓶标签上做好标记。
7. 实验开始前请将水浴锅预热至60℃。
8. 可将洗脱缓冲液Buffer EBL预热至60℃后使用。

操作步骤

1. 向离心管（自备）中加入**20 μ l Proteinase K**。

2. 加入**200 μ l**血清/血浆样本。

注意：当样品量超过200 μ l时，请等比例增加Proteinase K、Buffer CL和Buffer CB试剂用量，具体试剂加入量可参考附表。

3. 加入**160 μ l Buffer CL**，颠倒混匀，剧烈震荡至少30秒。

4. 60 $^{\circ}$ C孵育30分钟，其间颠倒混匀数次。

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

5. 加入**360 μ l Buffer CB（使用前检查是否加入异丙醇）**，震荡至彻底混匀。

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. 将步骤6所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DF）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向吸附柱中加入**500 μ l Buffer GW1（使用前检查是否加入无水乙醇）**，12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入**750 μ l Buffer GW2（使用前检查是否加入无水乙醇）**，12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

10. 向吸附柱中加入**750 μ l 无水乙醇**，12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

11. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应。

12. 将吸附柱置于新的离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入**20-100 μ l Buffer EBL或灭菌水**，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 将洗脱缓冲液Buffer EBL预热至60℃后使用,且离心之前室温孵育5分钟，可以增加产量。

3) 如果要提高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2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟。

4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用Buffer EBL洗脱并于-20℃保存。

附表：不同样本量推荐试剂加入量

样本体积 试剂加入量	200 μ l	300 μ l	600 μ l	800 μ l	1000 μ l
Buffer CL	160 μ l	240 μ l	480 μ l	640 μ l	800 μ l
Buffer CB	360 μ l	540 μ l	1080 μ l	1440 μ l	1800 μ l
Proteinase K	20 μ l	30 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及和其他用途