

M5 CWhipro Circulating Nucleic Acid Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 CWhipro Circulating Nucleic Acid Kit	50T	MF063-01

【储存条件】

Spin Column DF 室温下可保存 2 个月，4°C 保存 1 年；其余组分常温保存。

【试剂盒组分】

Component	50T
Buffer CL	45 ml
Buffer CB (concentrate)	60 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer EB	10 ml
Proteinase K	100 mg
Proteinase K Storage Buffer	5 ml
Spin Columns DF	
With Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5ml)	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 0.1-1ml 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。

【实验前准备及注意事项】

1. 向 Proteinase K 加入 5ml 的 **Proteinase K Storage Buffer** 使其溶解，-20°C 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 0.1-1ml 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 58°C 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°C。
8. 可将洗脱缓冲液 **Buffer EB** 预热至 60°C 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，使管壁和管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。12000rpm 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），12000rpm 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），12000rpm 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，12000rpm 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. 12000rpm 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 EB** 或灭菌水，室温放置 2-5 分钟，12000rpm 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 EB 预热至 60 $^{\circ}$ C 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，12000rpm 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 EB 洗脱并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。**

附表 1：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

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。