

M5 CWhipro Circulating DNA Midi Kit (负压法) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 CWhipro Circulating DNA Midi Kit	10T	MF064-01
M5 CWhipro Circulating DNA Midi Kit	50T	MF064-05

【储存条件】

Spin Column DG 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	10T	50T
Buffer CL	45ml	220ml
Buffer CB (concentrate)	60ml	300ml
Buffer GTL	12ml	60ml
Buffer GW1 (concentrate)	3ml	13ml
Buffer GW2 (concentrate)	3ml	15ml
Buffer EB	2ml	10ml
Proteinase K	100mg	3x180mg
Proteinase K Storage Buffer	5ml	30ml
Spin Columns DG		
With Collection Tubes	10	50
Tube Extenders 20ml)	10	50
VacConnectors	10	50
Centrifuge Tubes (L-1.5ml)	10	50

【产品简介】

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻的血清、血浆、羊水、尿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。本试剂盒使用负压法，同时配备延伸管，可处理多达 5ml 样本，纯化的 DNA 产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质污染。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. 向每管 **Proteinase K** 粉末中加入指定用量的 **Proteinase K Storage Buffer** 使其完全溶解，-20°C 保存。配制好的 **Proteinase K** 勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。其它组分可以在干燥、室温（15-30°C）环境下稳定保存一年。如需保存更长时间，可置于 2-8°C。

货号	MF064-01	MF064-05
Proteinase K Storage Buffer	5ml	每瓶加入 9ml

2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
3. 本试剂盒最多可以从 5ml 血清/血浆、4ml 尿液中提取 cfDNA。
4. 第一次使用前请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。

5. 第一次使用前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，在试剂瓶标签上做好标记。
6. 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°C 水浴孵育重新溶解，混匀后使用。
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。
9. 负压装置。

【操作步骤】

血清、血浆样本（1-6ml）

1. 样品处理：
向离心管（自备）中加入 1ml 血清/血浆样本，若样本不足 1ml，加入 PBS 溶液补至 1ml 体积。
注意：当样品量超过 1ml 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 1。
2. 向以上溶液中加入 100 μ l **Proteinase K**，混匀。
3. 加入 800 μ l **Buffer CL**，颠倒混匀，剧烈震荡至少 30 秒。
4. 60°C 孵育 30 分钟，其间颠倒混匀数次。
5. 加入 1800 μ l **Buffer CB**（使用前检查是否加入异丙醇），颠倒混匀 10 次或剧烈震荡 15-30 秒。
6. 冰浴 5 分钟。
7. 正确连接负压装置，将连接管（**VacConnectors**）插到负压装置的插口上。
8. 将吸附柱（**Spin Column DG**）插入到连接管上。
9. 将延伸管（**Tube Extenders**）插入开盖的吸附柱中。
注意：确保连接管、吸附柱和延伸管连接稳固，防止发生漏液。
10. 将冰浴后的混合溶液全部加入延伸管中，开启并调节负压至 -900~-800mbar，缓慢吸走管中溶液。待溶液完全吸走，关闭负压开关，当压力恢复至 0mbar 时，小心移去延伸管。
11. 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），开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。
12. 向吸附柱加入 750 μ l **Buffer GW2**（使用前检查是否加入无水乙醇），开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。
13. 向吸附柱中加入 750 μ l 无水乙醇，开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。
14. 当压力恢复至 0mbar 时，将吸附柱取下，置于新的收集管（**Collection Tube**）中，12000rpm 离心 3 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。
15. 将吸附柱置于新的 1.5ml 离心管（**Centrifuge Tube**）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 20-150 μ l **Buffer EB**，室温放置 3 分钟，12000rpm 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，-20°C 保存 DNA。

附表 1：不同血清/血浆样本量推荐加入试剂量

试剂加入量 \ 样本体积	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml
Proteinase K	100 μ l	200 μ l	300 μ l	400 μ l	500 μ l
Buffer CB	1.8ml	3.6ml	5.4ml	7.2ml	9ml
Buffer CL	800 μ l	1.6ml	2.4ml	3.2ml	4ml

尿液样本（1-4ml）

1. 样品处理：

向离心管（自备）中加入 1ml 尿液样本。若样本不足 1ml，加入 PBS 溶液补至 1ml 体积。

注意：当样品量超过 1ml 时，请等比例增加 Proteinase K、Buffer GTL、Buffer CL 和 Buffer CB 试剂用量，具体试剂加入量可参考附表 2。

2. 向以上溶液中加入 125 μ l **Proteinase K**，混匀。

3. 加入 1ml **Buffer CL**，250 μ l **Buffer GTL**，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。

5. 加入 3.6ml **Buffer CB**（使用前检查是否加入异丙醇），剧烈震荡 15-30 秒。

6. 冰浴 5 分钟。

7. 正确连接负压装置，将连接管（**VacConnectors**）插到负压装置的插口上。

8. 将吸附柱（**SpinColumn DG**）插入到连接管上。

9. 将延伸管（**Tube Extenders**）插入开盖的吸附柱中。

注意：确保连接管、吸附柱和延伸管连接稳固，防止发生漏液。

10. 将冰浴后的混匀溶液全部加入延伸管中，开启并调节负压至 -900~-800mbar，缓慢吸走管中溶液。待溶液完全吸走，关闭负压开关，当压力恢复至 0mbar 时，小心移去延伸管。

11. 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），开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

12. 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），开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

13. 向吸附柱中加入 750 μ l 无水乙醇，开启并调节负压至 -900~-800mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

14. 当压力恢复至 0mbar 时，将吸附柱取下，置于新的收集管（**Collection Tube**）中，12000rpm 离心 3 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。

15. 将吸附柱置于新的 1.5ml 离心管（**Centrifuge Tube**）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 20-150 μ l Buffer EB，室温放置 3 分钟，12000rpm 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，-20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

附表 2：不同尿液样本量推荐加入试剂量

试剂加入量 \ 样本体积	1ml	2ml	3ml	4ml
Buffer CL	1ml	2ml	3ml	4ml
Buffer CB	3.6ml	5.4ml	7.2ml	9ml
Proteinase K	125 μ l	250 μ l	375 μ l	500 μ l
Buffer GTL	250 μ l	500 μ l	750 μ l	1ml

【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。