

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案 1:从 1~5ml 样品中提取循环总核酸 (R4316)-----	4
方案 2:从 1~5ml 样品中提取循环 RNA (R4316)-----	6
常见问题回答-----	8

版本: 2021-02

简介

HiPure Circulating Nucleic Acid Kits 为血清、血浆和其它无细胞液体样品的循环 Nucleic Acid 提取提供了一个简单快速的解决方案。循环 Nucleic Acid 是指游离在细胞外的 Nucleic Acid,它是细胞凋亡产生的。循环 Nucleic Acid 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 Nucleic Acid 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 Nucleic Acid Kits 采用独特的溶液体系和多层不同孔径的滤膜,可高效处理大体积的血清、血浆样品,并高效捕获极微量的游离核酸。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下,可通过氢键和静电吸附核酸,而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐,最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水,洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高,可直接用于各种下游实验。

试剂盒基于硅胶柱纯化方式。血清或其它液体样品在裂解液(Buffer CFL)裂解消化,加入蛋白沉淀剂(Buffer CFP)后,离心去除蛋白质,得上清加入异丙醇沉淀总核酸,转移至柱子中过滤,DNA/RNA 被吸附上柱子的膜上,而蛋白质则不被吸附而随滤液流出去除。柱子经 Buffer VHB 洗涤蛋白质和其它杂质,经 Buffer RW2 洗涤去除盐分,最后 DNA/RNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA/RNA 可直接用于定量 PCR/RT-PCR,液相或固相芯片分析,杂交和 SNP 检测等分析。

组 成

HiPure Circulating Nucleic Acid Midi Kit (1~5ml)

产品编号	R4316-01	R4316-02
纯化次数	10 Preps	50 Preps
Buffer CFL	30 ml	150 ml
Buffer CFP	5 ml	30 ml
Buffer MGW1	20 ml	100 ml
Buffer RW2*	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	10 ml
HiPure RNA Micro Columns	10	50
HiPure Viral Midi Columns	10	50
15 ml Collection Tubes	10	50
2ml Collection Tubes	10	50
说明书	1	1

保 质 期

HiPure Circulating Nucleic Acid Kits 可在室温下(15~25℃)干燥保存 18 个月，长期保存时需置于 2~8℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96~100%)
- 异丙醇
- 按瓶子标签所示，加入等倍异丙醇稀释 Buffer MGW1，并于室温保存。
- 按瓶子标签所示，加入无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。

方案 1. 从 1~5ml 样品中提取循环 DNA/RNA

该方案适合于从 1~5ml 血清、血浆或其它无细胞液体样品中直接提取循环 DNA/RNA，包括 miRNA。

1. 4℃，1900 x g 离心 10 分钟分离血浆或血清，转移血浆或血清至新的离心管中。
2. 4℃，4,000~5,000 x g 离心 15 分钟进一步去除细胞残片等杂质，转移 1~5ml 上清液至新的离心管中。
3. **按 1ml 血浆或血清样品，加入 300µl Buffer CFL，涡旋混匀，室温静置 10~15 分钟。**

可选：按 1ml 血浆或血清样品，再加入 30µl Proteinase K 至样品中，颠倒混匀后，37 度温育 30 分钟有利于提高 DNA 的产量。

4. **按 1ml 血浆或血清样品，加入 100µl Buffer CFP 至样品中，高速涡旋 20 秒以上，冰上放置 3 分钟。**
这一步会产生大量的沉淀物，充分涡旋打散沉淀物，以防止核酸被沉淀物包裹在一起而损失产量。
5. 13,000 x g 离心 5 分钟或 4,000~5,000 x g 离心 15 分钟。
6. **转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积预冷的异丙醇（2%冰醋酸）至上清液，涡旋混匀 15 秒。**
7. 取一个 HiPure Viral Midi Column，装到 15ml 离心管中。

以下离心在室温下进行。

8. **转移 <4ml 混匀液至柱子中，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。**
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。重复第 8 步直到所有混合液都转移至柱子中，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer MGW1 至柱子中。4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。**
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer RW2 至柱子中。4,000**

- ~5,000 × g 离心 15 分钟。
12. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。加入 400µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。放置 5 分钟，4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
 13. 加入 200µl Buffer CFL 和 0.9 ml 无水乙醇至洗脱液中，涡旋混匀 10 秒。
 14. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中，转移 ≤750µl 混合液至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。
 15. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子，12,000 × g 离心 1 分钟。
 16. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
 17. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
 18. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 3 分钟。
 19. 打开柱子的盖子，室温放置 10 分钟进一步干燥柱子。
 20. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~50µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
 21. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

方案 2. 从 1~5ml 样品中提取循环 RNA

该方案适合于从 1~5ml 血清、血浆或其它无细胞液体样品中直接提取循环 RNA，包括 miRNA。

1. 4℃, 1900 x g 离心 10 分钟分离血浆或血清，转移血浆或血清至新的离心管中。
2. 4℃, 4,000~5,000 x g 离心 15 分钟进一步去除细胞残片等杂质，转移 1~5ml 上清液至新的离心管中。
3. **按 1ml 血浆或血清样品，加入 300µl Buffer CFL，涡旋混匀，室温静置 10~15 分钟。**
4. **按 1ml 血浆或血清样品，加入 100µl Buffer CFP 至样品中，高速涡旋 20 秒以上，冰上放置 3 分钟。**
这一步会产生大量的沉淀物，充分涡旋打散沉淀物，以防止核酸被沉淀物包裹在一起而损失产量。
5. 13,000 x g 离心 5 分钟或 4,000~5,000 x g 离心 15 分钟。
6. **转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积预冷的异丙醇（3%冰醋酸）至上清液，涡旋混匀 15 秒。**
7. 取一个 HiPure Viral Midi Column，装到 15ml 离心管中。

以下离心在室温下进行。

8. **转移 <4ml 混匀液至柱子中，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。**
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。重复第 8 步直到所有混合液都转移至柱子中，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer MGW1 至柱子中。4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。**
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer RW2 至柱子中。4,000~5,000 x g 离心 10 分钟。**

12. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。加入 600 μ l Buffer CFL 至柱子的膜中央。放置 5 分钟，4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟。
13. 加入和 0.9ml 无水乙醇至洗脱液中，涡旋混匀 10 秒。
14. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中，转移 \leq 750 μ l 混合液至柱子中，12,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子，12,000 \times g 离心 1 分钟。
16. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2 至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
17. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2 至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
18. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 3 分钟。
19. 打开柱子的盖子，室温放置 10 分钟进一步干燥柱子。
20. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
21. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
Nucleic Acid 产量低	
样品 DNA/RNA 含量低	样品中循环 DNA/RNA 含量很低，提高样品的体积
没有采用 EDTA 作为抗凝剂	血液采集时，应使用 EDTA 作为抗凝剂，以防止循环核酸发生降解。
样品冻融超过一次	循环 DNA 很容易发生降解。样品解冻后不能再用。
柱子堵塞	加入 Buffer CFP 后，混匀不充分
洗脱效率不够	加大洗脱液体积加到膜中央，室温放置 3 分钟。Nuclease Free Water 的洗脱体积不够。
Buffer MGW1 和 Buffer RW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 3 分钟以去除膜上残留的乙醇。