

操作手册

血清/血浆游离 DNA 提取试剂盒

Catalog No. TD476-50 (50 次反应)

Highlights

- 可从 10ml 以内的血清/血浆，1ml 以内的羊水或脑脊液中提取到高纯度的游离 DNA。
- 获得的 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等分子生物学实验。

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
蛋白酶 K	-20°C (混匀之后)	4x125 mg
蛋白酶 K 保存液	室温	2 x14 ml
SP 消化液	室温	2 x32 ml
SP DNA 结合液	室温	4x170 ml
SP DNA 洗涤液 1	室温	2x10 ml
SP DNA 洗涤液 2	室温	2x12 ml
DNA 洗脱液	室温	10 ml
3 号柱 S 套装	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

注意事项:

1. 环境温度低时 SP 消化液或者 SP DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 蛋白酶 K 及其保存液可常温运输。

特性:

- **样品种类:** 血清，血浆，羊水和脑脊液 (CSF)
- **处理的体积量:** 血浆- 单次离心: 最多 3ml 两次离心: 最多 10ml
血清- 最多 10ml
羊水- 最多 1ml

脑脊液- 最多 1ml

- **DNA 纯度:** 获得的 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于 qPCR 高通量测序等各种分子生物学实验。
- **DNA 回收情况:** 回收的 DNA \geq 100bp(本试剂盒针对无细胞的 DNA 提取经过优化)，总量根据不同的样品个体差异可能会比较大。一般从血清或血浆中提取到的 DNA 浓度在 1-100 ng/ml。
- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴（55℃）。微型离心机，负压多联器或立式离心机。

试剂制备:

1. 使用前需要添加6.5ml蛋白酶K保存液到蛋白酶K (125mg)里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。混匀之后放在-20℃保存
2. 使用前需要添加48 ml 95-100%的无水乙醇到12ml的**SP DNA洗涤液2**中。

操作步骤:

从 \leq 5ml 的样品中提取游离 DNA

除非特殊说明，一般常温（15-30℃）进行以下操作步骤。

以下步骤以 200 μ l 血浆，血清或其他生物液体样品为例，当样品量发生变化的时候，只需要等比例的调整 SP 消化液，蛋白酶 K 和 SP DNA 结合液的用量就可以。

1. 添加 50 μ l 的 SP 消化液到每 200 μ l 的样品中，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
2. 添加 20 μ l 的蛋白酶 K 到每 200 μ l 的样品中，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
3. 在 55℃下孵育 30 分钟。
4. 添加 2 倍体积的 SP DNA 结合液到步骤 3 中消化的样品中，混匀。

样品体积	200 μ l	1ml	3 ml	5 ml
SP 消化液	50 μ l	250 μ l	750 μ l	1.25 ml
蛋白酶 K	20 μ l	100 μ l	300 μ l	500 μ l
混匀并且在 55℃下孵育 30 分钟				
SP DNA 结合液	540 μ l	2.7 ml	8.1 ml	13.5 ml

表 1

以下步骤可以通过真空负压的方式也可以通过离心的方式进行操作（负压设备所用真空多连器推荐美国 ZYMO

RESEARCH 公司)

负压操作步骤:

5. 确认 **3号柱 S 套装** (连接 **15ml 套筒**) 连接紧密后放置在负压多连器上。
6. 倒入上述步骤 4 的混合液 (含 **SP DNA 结合液**)，打开真空开关使液体完全通过柱子。确保液体完全通过柱子并且没有残留液体下流后，关闭真空泵并拔掉连接的 **15ml 套筒**。

以下步骤 7-8 也可以用台式离心机操作。

7. 关掉真空开关，倒入 **400 μ l SP DNA 洗涤液 1** 到柱子上，打开真空开关，让液体完全通过 **3号柱 S**。
8. 关掉真空开关，加入 **700 μ l SP DNA 洗涤液 2** (请先检查是否已加入无水乙醇!) 到 **3号柱 S** 内，打开真空开关让液体完全通过柱子。
9. 重复第 8 步。
10. 将 **3号柱 S** 套在 **2ml 收集管** 上，然后放置在台式离心机上全速离心 **2 分钟** 以去除残留乙醇。
11. 将 **3号柱 S** 套在一个干净的 **1.5ml 离心管** 内，添加 **50 μ l 的 DNA 洗脱液** 到柱基质上。(洗脱液事先在 **65-70 $^{\circ}$ C** 水浴中预热，洗脱效果更好)，室温放置 **3 分钟**，在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心 **1 分钟** 来洗脱 **DNA**。

离心操作步骤:

1. 确认 **3号柱 S (连接 15ml 套筒)** 连接紧密后放置在一个 **50ml 离心管** 里。
2. 倒入上述步骤 4 的混合液 (含 **SP DNA 结合液**) **10ml**，在 **1, 000 x g** 离心力下离心 **2 分钟**，弃废液。重复此步骤直到所有的混合液全部离心过柱。
3. 拧开 **3号柱 S** 上面的桔色盖子，并将盖子和连接的 **15ml 套筒** 丢弃。
4. 将 **3号柱 S** 套在 **2ml 收集管** 上，放到台式离心机内，添加 **400 μ l SP DNA 洗涤液 1** 到 **3号柱 S** 内，在 **1, 000 x g** 离心力下离心 **1 分钟**，弃废液。
5. 加入 **700 μ l SP DNA 洗涤液 2** (请先检查是否已加入无水乙醇!) 到 **3号柱 S** 内，在 **1, 000 x g** 离心力下离心 **1 分钟**，弃掉废液。
6. 加入 **400 μ l SP DNA 洗涤液 2** (请先检查是否已加入无水乙醇!) 到 **3号柱 S** 内，全速离心 **1 分钟** 去除乙醇残留。

7. 将 **3号柱 S** 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 $\geq 50\mu\text{l}$ 的 DNA 洗脱液到柱基质上。（洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心 1 分钟来洗脱 DNA。

注意：一般从血清血浆中提取的 DNA 总量会比较低，不推荐使用 Nanodrop 进行检测。可以使用 qPCR, Tapestation 或者 Qubit 等进行 DNA 的定量。

从 5-10ml 的样品中提取游离 DNA

1. 添加 250 μl 的 SP 消化液到每 1ml 的血清，血浆等生物体液中，混匀。（根据表格 2 按照一定比例添加试剂）
2. 添加 100 μl 的蛋白酶 K 到每 1ml 的血清，血浆等生物体液中，混匀。（根据表格 2 按照一定比例添加试剂）
3. 在 55°C 下孵育 30 分钟。
4. 添加 2 倍体积的 SP DNA 结合液到步骤 3 中消化的样品中，混匀。

样品体积	1ml	6ml	8 ml	10 ml
SP 消化液	250 μl	1.5 ml	2 ml	2.5 ml
蛋白酶 K	100 μl	600 μl	800 μl	1 ml
混匀并且在 55°C 下孵育 30 分钟				
SP DNA 结合液	2.7 ml	16.2 ml	21.6 ml	27 ml

表 2

5. 确认 **3号柱 S**（连接 15ml 套筒）连接紧密后放置在一个 50ml 离心管里。
6. 倒入上述步骤 4 的混合液（含 SP DNA 结合液）10ml, 在 1, 000 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟，弃废液。重复此步骤直到所有的混合液全部离心过柱。
7. 拧开 **3号柱 S** 上面的桔色盖子，并将盖子和连接的 15ml 套筒丢弃。
8. 将 **3号柱 S** 套在 2ml 收集管上，放到台式离心机内，添加 400 μl SP DNA 洗涤液 1 到 **3号柱 S** 内，在 1, 000 $\times g$ 离心力下离心 1 分钟，弃废液。
9. 加入 700 μl SP DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇!）到 **3号柱 S** 内，在 1, 000 $\times g$ 离心力下离心 1 分钟，弃掉废液。
10. 加入 400 μl SP DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇!）到 **3号柱 S** 内，全速离心 1 分钟去除乙醇残留。

11. 将 **3 号柱 S** 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 $\geq 50\mu\text{l}$ 的 DNA 洗脱液到柱基质上。（洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心 1 分钟来洗脱 DNA。