

【产品名称】 游离 DNA 小柱中提试剂盒

【预期用途】 本产品基于小柱中提硅胶柱纯化方式，适合于从 1-10ml 血浆、血清、体液等样品中提取游离 DNA，DNA 产物可用于临床体外检测使用。

【检验原理】 样品在消化液 ADL 和蛋白酶 K 作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入结合液后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随溶液滤出。柱子经洗涤液 DCW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经洗涤液 DCW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、病毒检测等实验。

【主要组成成份】

货号	D3184-01	D3184-02	D3184-03
吸附大柱 F4	4	10	50
50ml 收集管 (垫片)	4	10	50
5ml 圆底离心管	4	10	50
Carrier RNA	110 µg	110 µg	110 µg
Proteinase K Solution	4.5 ml	11 ml	2 x 26 ml
消化液 ADL	50 ml	120 ml	550 ml
洗涤液 DCW1*	4.4 ml	13 ml	44 ml
洗涤液 DCW2*	5 ml	10 ml	50 ml
洗脱液 EB	10 ml	10 ml	20 ml

【储存条件及有效期】 本产品在室温下运输，收到产品后，把 Proteinase K Solution 保存于 2-8℃，产品有效期 18 个月。

【准备工作】

- 使用前，洗涤液 DCW1 按标签所示，加入 5.6ml/17ml/56ml 无水乙醇进行稀释。
- 使用前，洗涤液 DCW2 按标签所示，加入 20ml/40ml/200 ml 无水乙醇进行稀释。
- 根据血浆/血清体积计算蛋白酶 K 和消化液 ADL 和异丙醇的用量。
- 溶解 Carrier RNA (1µg/µl): 加入 110µl Nuclease Free Water 至装有 Carrier RNA 干粉管至终浓度为 1µg/µl。涡旋混匀让 Carrier RNA 干粉充分溶解。溶解后分装保存于-20℃。
- 若采用水平或桶状离心机时，把离心速度调至最高速度(~5000rpm)，由于水平转子离心力比较低，洗脱时死体积较大(~30µl)，建议每次加入不少于 100µl 洗脱液以充分洗脱出 DNA。使用角度离心机时，洗脱时提高离心速度至 11000rpm，可以有效减少死体积至~10µl，此时为获得更高浓度核酸，每次洗脱可以低至 50µl。

【血浆的分离与保存】

- 取 EDTA 抗凝血，4℃，1900 x g (3000 rpm) 离心 10 分钟，小心吸取上层血浆至高速离心管中，不要干扰中间的白膜层。一般 10 毫升的血液中可以获得约 4-5 毫升的血浆。
- 4℃，16,000 x g 离心 10 分钟，清除细胞碎片和附着在细胞碎片上的额外细胞核酸，以及来自受损血细胞的 gDNA 和 RNA。
- 小心将上清液移到新的离心管中，不要吸到沉淀。如果当天使用时，2-8℃ 保存待用。长期保存时，-80℃ 保存。冻存血浆或血清样品，使用前先在室温下解冻。若解冻后样品中有沉淀物产物，4℃，16,000 x g 离心 5 分钟后，小心转移上清液至新的离心管中。

实验步骤 (1~10ml)

1. 转移 0.1 倍样品体积的蛋白酶 K 至 10~15ml 离心管中。
例：2ml 样品，需要加入 0.2ml 蛋白酶 K。处理 5ml 样品需要加入 0.5ml 蛋白酶 K。
处理尿液或积液时，蛋白酶 K 只需要加入 0.05 倍。如处理 10ml 尿液时，只需加入 0.5ml 蛋白酶 K。需要处理更多样品时，按比例放大蛋白酶 K、Buffer ADL 以及异丙醇的用量，需要更多的 ADL 和蛋白酶 K 时，请另外订购。
2. 转移 1~10ml 血清、血浆或其它液体样品至装有蛋白酶 K 的离心管中，颠倒混匀 6-8 次，室温放置 15 分钟。
3. 加入等倍样品体积的 Buffer ADL 和 5 μ l Carrier RNA，颠倒 10 次，55 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，其间颠倒混匀数次。
4. 加入 0.5 倍样品体积异丙醇，立即快速颠倒混匀 10-15 次，冰上放置 5 分钟。
例：10ml 液体样品，对应加入 1ml Proteinase K，10ml Buffer ADL 和 5ml 异丙醇。
5. 把纯化大柱 F4 装在 50ml 离心管中，转移不超过 15ml 混合液至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟。
倒弃滤液，把柱子套回收集管中，把余下的混合液转移至柱子中并离心。
第 5-7 使用水平或桶状离心机，5000rpm 离心 2 分钟。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中，加入 1.5 ml Buffer DCW1，8,000 rpm 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中，加入 4.5 ml Buffer DCW2，8,000 rpm 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中，11,000 rpm 离心 3 分钟。
采用水平桶状离心机，这一步建议最高速度（5000~5500rpm）离心 10 分钟甩干柱子。
9. 取出柱子，于 55 度烘箱中烘干 10 分钟。倒弃滤液，把收集管反扣于吸水纸拍打吸尽残液晾干。
10. 把 1.5ml 离心管装在 5ml 离心管中，并一起放到 50ml 收集管中。
11. 加入 60 μ l Elution Buffer 至纯化大柱 F4 的膜中央，然后纯化大柱 F4 放回收集管中，并让柱子底部插入 5ml 离心管的管口，静置 2 分钟，11000rpm 离心 1 分钟。
这一步推荐高速角度离心机以充分甩出洗脱液。若需得到最高产量，再加入 30 μ l Elution Buffer 进行第二次洗脱。采只有水平桶状离心机，建议两次洗脱，每次用 80 μ l 洗脱液。

12. 弃去柱子，用镊子挑出 5ml 离心管或 1.5ml 离心管，盖好盖子，待用或保存于-20 度。

【产品的局限性】

样品提取效率与操作者是否严格按照说明书操作有关。

【产品性能指标】

1. 外观检查：试剂盒应组份完全，包装外观清洁、无泄漏、无破损；标志、标签字迹清楚。
2. 核酸回收率：按说明书处理 100ng DNA 样品时，DNA 回收率超过 80%，且 CV 值小于 10%。
3. 短片段回收率：按说明书处理 100bp DNA Marker 时，100bp DNA 片段要超过 80%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本说明书。
3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜。
标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
4. 所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。