

游离 DNA 提取试剂盒使用说明书

【产品名称】

通用名称：游离 DNA 提取试剂盒

英文名称：Cell Free DNA Extraction Kit

【包装规格】 24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒

【预期用途】用于核酸的提取、富集、纯化等步骤。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【实验原理】本试剂盒采用具有分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，在特定的盐离子浓度和 pH 值条件下，磁珠特异的吸附小片段的游离 DNA，不吸附基因组 DNA。能够更好的适用于产前无创诊断和癌症基因分析诊断。

【主要组成成分】

组成	24 人份	48 人份	96 人份
裂解液 CFL	30mL	60mL	120mL
蛋白酶 K(20mg/mL)	550 μ L	1.1mL	1mL \times 2
20%SDS	5mL	10mL	15mL
离心柱	24 个	48 个	96 个
漏斗	24 个	48 个	96 个
1.5mL 离心管	24 个	48 个	96 个
2mL 离心管	24 个	48 个	96 个
离心柱接头	24 个	48 个	96 个
漂洗液	24mL	48mL	96mL
洗脱液	5mL	5mL	10mL

另需要准备的试剂及注意事项

➢ 无水乙醇（分析纯）、超纯水或去离子水。

【储存条件及有效期】 试剂盒储存在常温，有效期 12 个月。

【适用仪器】 高速冷冻离心机、真空负压装置及真空泵

【样品要求】

1 用装有 EDTA 抗凝剂的采血管取病人或孕妇（孕 12-24 周）5 mL 全血，上下颠倒混匀，4°C 运输。

2 在离心机中 3000 rpm 的转速下，离心 10min 分离血清。按 2mL/支收集血清，直接进入下一步实验或 -20°C 储存。

【实验准备】

- 使用前用无水乙醇稀释漂洗液，做好标记√。

规格	漂洗液
<input type="checkbox"/> 24 人份	加入 36mL 无水乙醇，混匀
<input type="checkbox"/> 48 人份	加入 72mL 无水乙醇，混匀
<input type="checkbox"/> 96 人份	加入 144mL 无水乙醇，混匀

- 现配制 80%乙醇：取 20mL 超纯水，加入 80mL 的无水乙醇，上下颠倒混匀。

【实验步骤】

1. 血清/血浆样本预处理

取 1mL 血清/血浆 12000rpm 离心 10 min，收集上清，用于游离核酸的提取。

注意:也可将血清/血浆样本在 6000×g 下离心 30min 以去除剩余的血细胞和细胞碎片。

2. 蛋白酶 K 处理

2.1 按照下表指示顺序，添加试剂到 15mL 离心管：

试剂	体积			
血浆/血清体积	1mL	2mL	4mL	10ml
蛋白酶 K(20mg/mL)	20μL	40μL	80μL	200μL
20%SDS	130μL	260μL	520μL	1040μL
total	1.15mL	2.30mL	4.60mL	11.24 ml

注意：不要将 SDS 直接加到蛋白酶 K 中，以避免蛋白酶 K 失去活性。

2.2 混匀后在恒温混匀仪或水浴锅中 56°C 孵育 10min；

2.3 孵育完毕后，将离心管放在冰上 2min，冷却到室温(此步骤是让溶液平衡至室温更有利于游离 DNA 的结合，不可忽略)。

3. 游离核酸提取

3.1 在步骤 2.3 离心管中加入 1.25mL 裂解液 CFL 涡旋混匀，室温放置 10min 后（期间摇匀 2-3 次）；将 50mL 的漏斗插入离心柱中，然后将柱子和离心柱接头插入真空抽滤装置的鲁尔接头上；打开真空泵，压力约 800mbar 即可；将所有液体倒入 50mL 的漏斗中，使所有液体通过离心柱。

（离心柱接头可以防止样品间的交叉污染，是一次性用品，用完按照医疗器械废物处理）

3.2 加入 800μL 漂洗液（使用前请检查是否已加入指定量的无水乙醇）到上述漏斗中，使液体完全通过离心柱；

3.3 重复一次步骤 3.2；

3.4 加入 800μL 80%乙醇到上述漏斗中，使液体完全通过离心柱；

3.5 重复一次步骤 3.4；

3.6 将离心柱从负压装置上取下，插入 2mL 的离心管中，12000rpm 离心 5min，以确保乙醇完全去除。

3.7 将离心柱转移新的 1.5ml 的离心管中，加入 50μL 洗脱液，放置 2min；12000rpm 离心 2min，弃离心柱，并保存离心管中的液体至 -20°C 或进入下一步实验。

（为确保实验成功，洗脱液可以预热至 65°C，您可以适当调整洗脱体积，洗脱体积可以调整至 20μL~50μL。）

【检验方法的局限性】

推荐使用 Agilent Bioanalyzer 2100 对提取得到的核酸进行检测，若使用 Thermo fisher nano-drop 测量，结果仅供参考，不作为评估提取核酸质量的结果。

【检验结果的判定】

使用仪器 Agilent Bioanalyzer 2100 检测结果中，100 bp ~ 500 bp 之间最少有一个峰值，且最高峰值位于 167±10bp 处。

【注意事项】

1. 蛋白酶 k 处理样本时，先加蛋白酶 K,再加样本，最后加 20%SDS,不要将 SDS 直接与蛋白酶 K 混合，以免蛋白酶 K 失去活性。
2. 裂解液 CFL 的用量要根据血清、血浆的体积等倍数的增加，例如：当血清、血浆的体积为 2mL 时，需要加入裂解液 CFL 的体积为 2.5mL；当血清、血浆的体积为 4mL 时，加入裂解液 CFL 的体积为 5mL。
3. 漂洗液中含有易挥发成份，保存时确保瓶盖旋紧。
4. 提取程序运行结束后 10min 内需取出核酸溶液，避免游离核酸长时间暴露在空气中而降解。
4. 实验开始前后，请清洁工作台，并进行消毒。
5. 试剂使用前应在常温下混匀。

【参考文献】

1. 严子禾等.4 种血浆游离 DNA 提取方法的比较. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science .2006, Vol.24, No.5.
2. Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K. et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 190-196.
3. Lun F M, Chiu R W, Allen Chan K C, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem,008,4(10): 1664-1672.
4. Kyong-Ah Yoon, Sohee Park, et al. Comparison of Circulating Plasma DNA levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls[J]. Journal of Molecular Diagnostics ,2009, Vol,11, NO.3, 182-185.

【基本信息】

企业名称：广州艾基生物技术有限公司

住所：广州市国际生物岛螺旋三路3期4栋505

邮政编码：510503

电话号码：020-89053723

传真号码：020-89053723

电子邮箱：market@igebio.com

公司网址：www.igebio.com

售后服务单位名称：广州艾基生物技术有限公司

服务热线：020-89053723

传真号码：020-89053723

电子邮箱：market@igebio.com