

血浆游离核酸纯化试剂盒说明书

产品组成

血浆游离核酸纯化试剂盒	5次制备	50次制备
Cat. No.	3113005	3113050
纯化柱延长管	5个	50个
连接管	5个	50个
核酸纯化柱	5个	50个
2 ml 离心管	5个	50个
1.5 ml 离心管	5个	50个
蛋白酶 K 贮存液	1.3 ml×2	9 ml×3
Carrier RNA	60 µl	600 µl
Buffer VL	26 ml	130 ml×2
Buffer AC (浓缩液)	37 ml	156 ml×2
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	19 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	15 ml
Buffer TE	2 ml	20 ml
说明书	1份	1份

产品储存

1. 蛋白酶 K 贮存液与 Carrier RNA 可室温运输，收到后请于-20℃储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 1-5ml 新鲜的或者是冷冻贮藏的体液样品（包括血浆、血清、尿液、CSF 及细胞培养上清）中分离纯化游离核酸。特别为从大体积（5 ml）血浆中设计的纯化方案，确保极痕量（1-2 copies/ml）的核酸也能高效地被浓缩、吸附到纯化柱上，痕量的核酸连同 Carrier RNA 经 Buffer WA 和 Buffer WBR 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇、异丙醇
2. 50 ml 离心管和 1.5ml 离心管（推荐选用 DNase-free & RNase-free 的 1.5ml 离心管）
3. 移液器吸头（为避免样品间的污染，请选用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
6. 水浴锅与旋涡震荡器

使用前准备

- 1) 如果试剂盒贮存于 2~8℃，使用前请提前一天将试剂盒放置于室温（15~25℃）环境中。
- 2) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
- 3) 将水浴锅温度设置到 60℃，并将 Buffer TE 在 60℃ 温育。
- 4) 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer AC 中加入异丙醇、在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。

操作步骤

以下步骤是从 5 ml 血浆中分离核酸而设计的，如果从其他体积的血浆中分离核酸，按每 1 ml 血浆+100 μ l 蛋白酶贮存液+1 ml Buffer VL+ 2 ml Buffer AC 的比例加入相应试剂；Carrier RNA、Buffer WA、Buffer WBR 及 Buffer TE 的用量则保持不变。

1. 吸取 500 μ l 蛋白酶 K 分别加入到 50 ml 离心管（用户自备）中，再加入 5ml 血浆样本。

* 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的血浆进行核酸的分离纯化。使用冻融超过一次以上的血浆进行核酸分离时，应先将血浆于 6800 rpm 离心 3 分钟，吸取上清进行核酸的分离；否则血浆中因反复冻融所产生的冷凝蛋白可能在操作过程中堵塞核酸纯化柱，导致核酸分离失败。

* 某些用于检测的核酸片段在每毫升血浆中仅有几个拷贝，因此在条件允许的前提下，应尽可能使用最大体积的血浆样本进行核酸的浓缩与纯化。

* 不要将蛋白酶K直接加入到Buffer VL中。

2. 加入 5 ml Buffer VL，再加入 10 μ l Carrier RNA，旋涡振荡约 30 秒混匀。

3. 将离心管置于 60 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。

4. 加入 10 ml Buffer AC，混合均匀。

* 确认在 Buffer AC 中已经加入异丙醇。

5. 将连接管插入到负压装置的插口上；再在连接管上插上核酸纯化柱；最后在核酸纯化柱上插入纯化柱延长管（详见负压装置说明书）。将步骤 4 中的混合液倒入纯化柱延长管中，开启负压，使液体全部滤过核酸纯化柱。

*为了避免交叉污染，请不要将连接管重复使用。

*为了避免交叉污染，不要将纯化柱直接插入到负压装置的插口上。

6. 暂停负压，取下并丢弃纯化柱延长管。加 600 μ l Buffer WA 到纯化柱中，开启负压吸尽纯化柱中溶液。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇

7. 暂停负压，加 800 μ l Buffer WBR 到纯化柱中，开启负压吸尽纯化柱中溶液。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 暂停负压，加 900 μ l 无水乙醇到纯化柱中，开启负压吸尽纯化柱中溶液。

9. 关闭负压，待负压消失后取下并丢弃连接管，盖上纯化柱管盖，将核酸纯化柱放入试剂盒提供的 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

10. 弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个试剂盒提供的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50 μ l Buffer TE，盖上管盖，室温静置 3 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 用低于 50 μ l 的洗脱体积洗脱核酸，并不能确保增加核酸的浓度，相反可能因膜不能被完全润湿而降低核酸的洗脱效率。在 50 μ l PCR 反应体系中，加入 20 μ l 用本产品纯化的核酸作为模板，未见明显的抑制反应。推荐用增加模板使用量的方法提高检测的灵敏度。

11. 弃纯化柱，洗脱的血浆游离核酸可立即用于 PCR 或 RT-PCR 检测，或者将核酸储存于 -20 $^{\circ}$ C 或更低的温度条件下备用。