

cfDNA Extraction Mini Kit I

游离 DNA 中量提取试剂盒 I

本产品适合于从 2ml 血清血浆样品中提取游离 DNA。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，整个提取过程只需 60 分钟。得到的 DNA 可直接用于定量 PCR, 芯片分析, SNP 检测等实验。

产品组份

| 产品编号 | DNC373-02 | DNC373-03 |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 |
| DNA Extraction Mini Columns C | 10 | 50 |
| 2ml Collection Tubes | 10 | 50 |
| Vac-Tube | 10 | 50 |
| ET-Tube | 10 | 50 |
| Buffer VAL | 25 ml | 50 ml |
| Buffer VLB | 50 ml | 100 ml |
| Buffer W1C | 4.4 ml | 13 ml |
| Buffer W2C | 5 ml | 20 ml |
| Binding Enhancer | 1 | 1 |
| Proteinase K | 2.2 ml | 11 ml |
| Buffer EB | 2 ml | 10 ml |

保存条件

本产品除 Binding Enhancer 外，可在室温(15~25°C)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8°C。低温下，Buffer VAL 可能会有沉淀形成，需 55°C 水浴让沉淀完全溶解。Binding Enhancer 室温运输，收到产品后请保存于 -20~-8°C。

准备事项

- 水浴锅
- Buffer W1C 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2C 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Binding Enhancer 使用前，按标签所示加入 Buffer EB 或无酶水。

实验步骤

1. 转移 2ml 血清血浆样品及 200 μ l Proteinase K 至 2ml 离心管中。
2. 加入 2ml Buffer VAL 及 2 μ l Binding Enhancer 至离心管中，颠倒混匀充分，高速涡旋 15 秒。60°C 水浴 30 分钟。期间颠倒混匀 4~5 次。
该步骤必须涡旋混匀，若未涡旋混匀即加热会导致提取的 DNA 产量及纯度大大下降。
3. 加入 4ml Buffer VLB 至混合液中，涡旋混匀 15 秒，室温放置 10 分钟。
4. 将 DNA Extraction Mini Columns C 及 Vac-Tube 按顺序连接至真空抽滤盒中。之后将 ET-Tube 插入至 DNA Extraction Mini Columns C 中。
5. 将第 3 步中获得的混合液加入至 ET-Tube 中，打开真空泵抽滤直至所有混合液过柱。关闭真空泵，压力恢复后取出 DNA Extraction Mini Columns C。

过柱纯化

6. 将 DNA Extraction Mini Columns C 装在 2ml Collection Tubes 中，13,000 x g 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液，加入 500 μ l Buffer W1C 至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2C 至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2C 至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 x g 离心 3 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 30 μ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于 55°C 烘箱干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 30 μ l, 若对产量要求较高, 推荐进行第二次洗脱, 将洗脱液重新加至柱子膜中央, 室温静置 3 分钟, 13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品发生溶血：**注意不要用溶血的血液作为样品。
- **样品消化不充分：**加入裂解液后需要充分涡旋混匀，否则裂解不充分。
- **蛋白酶 K 失活：**蛋白酶 K 不能与 Buffer VAL 预先混合，会导致失活。

2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- Buffer W1C/W2C 没有加入乙醇稀释。
- 洗脱液加入量过少，建议干燥充分后洗脱，并增加洗脱次数。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。