

**AipPure 血清/血浆游离核酸(DNA/RNA)提取试剂盒(离心柱型)**  
**AipPure Circulating Nucleic Acid(DNA/RNA) Mini Kit(Centrifugal Column)**

**使用说明书**

- ◆ 版本号：240220
- ◆ 目录号：RE235
- ◆ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE235-01)
蛋白酶 K 溶液 (20mg/mL)	4℃或室温	5mL
溶液 ACL	室温	40mL
溶液 ACB	室温	60mL 第一次使用前按说明加指定量异丙醇
去蛋白液 PE	室温	16mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	5mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆ **适用范围** 适用于从血浆、血清、尿液或者其它无细胞体液中提取游离循环DNA/RNA和病毒核酸DNA/RNA。

◆ **产品储存**：本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。不合适的储存于低温(4℃或-20℃)会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下(15-25℃)进行。蛋白酶K保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过20℃室温至少保存6个月，4℃保存12个月，-20℃保存2年。

◆ **产品介绍**：本试剂盒适用于从新鲜或冷冻(冰冻后没有解冻过，冻融会影响质量)的血浆、血清、尿液等无细胞体液中提取游离循环核酸(DNA/RNA)。爱普科学针对游离循环核酸片段小和含量低的特点，精心研发了独特的缓冲液系统，确保高效提取游离循环核酸(DNA/RNA)。纯化的游离循环核酸产量高、完整性好，最大限度的去除了蛋白、色素、脂类及其他抑制物。本试剂盒可处理0.1-1mL的液体样本，配置的高效微量吸附柱洗脱体积可低至20uL。游离核酸含量极低(典型浓度1-100ng/mL血浆)，纯化得率与样本的类型、储存条件、时间以及个体间差异有很大关系。本试剂盒纯化得到的游离DNA

质量稳定可靠、纯度高，可直接用于PCR、荧光定量PCR、酶切和二代测序等相关分子生物学实验。

◆产品特点：

1. 操作安全，完全不使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 操作简单，快速便捷，单个样品操作一般可在 50 分钟内完成。
3. 针对游离循环核酸片段小和含量低的特点，精心研发了独特的缓冲液系统，确保高效提取游离循环核酸(DNA/RNA)。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，纯化的游离核酸质量稳定可靠、产量高、完整性好，用于下游相关实验表现效果更佳。

◆注意事项：

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，异丙醇。
3. 实验开始前请将水浴锅预热至 60°C。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
5. 样品冰冻保存后直到提取前应避免解冻，如果确实无法避免，应避免多次反复冻融，否则会导致提取量下降。
6. 建议处理前 4°C 以 16,000xg 离心 5-10 分钟，可以进一步去除细胞碎片，减少来自于受损血细胞的 gDNA 和 RNA 的污染。冰冻后如果出现微小蛋白沉淀的情况下，也建议 4°C 以 16,000xg 离心 5 分钟。
7. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
  - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
  - 2) 使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
  - 3) RNA 在裂解液中时不会被 RNase 降解，但提取后继续处理过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
  - 4) 配制溶液应使用 RNase-free 的水。(将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37°C 放置过夜，高压灭菌)
8. 本试剂盒可以提取 0.1-1mL 液体样品。如果处理样品为尿液，需要联系爱普科学 ([www.ipresci.com](http://www.ipresci.com)) 或相关业务人员单独订购溶液 ATL。尿液样本的操作步骤请参考说明书后面的附录二。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

**提示:** 第一次使用前请先在漂洗液 RW 和去蛋白液 PE 瓶中按照该组分标签上的指示, 加入指定量无水乙醇, 和溶液 ACB 瓶中按照该组分标签上的指示, 加入指定量异丙醇, 充分混匀后请及时在标签上标记, 以免多次加入!

1. 向 1.5mL 离心管中加入 20uL Proteinase K。

**注:** 如果起始处理量超过 300uL 体积的样本, 需选择更大容积的适合离心管。

2. 加入 200uL 血清/血浆样本。

**注:** 当样品量超过 200uL 时, 请按比例增加溶液 ACL、溶液 ACB 和 Proteinase K 试剂用量, 具体试剂加入量可参考说明书后面的附录一。

3. 加入 160uL 溶液 ACL, 混匀, 涡旋震荡至少 30 秒。

4. 60°C 孵育 30 分钟, 其间颠倒混匀数次。

**注:** 200uL 血清/血浆样本 60°C 孵育 10-15 分钟即可。

5. 加入 360uL 溶液 ACB(使用前检查是否加入异丙醇), 涡旋震荡 15-30 秒混匀。

6. 冰浴 5 分钟, 短暂离心, 使管壁和壁盖上的液体集中到管底。

7. 立刻将混合物(每次小于 750uL, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中(吸附柱放入收集管中), 13,000rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

8. 加入 500uL 去蛋白液 RE, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。

9. 加入 750uL 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。

10. 加入 750uL 无水乙醇, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。

11. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去乙醇, 以免残留乙醇抑制下游反应。

12. 取出吸附柱 RA, 放入一个新的无酶的 1.5mL 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加入 20-50uL RNase-free Water(事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 2 分钟, 13,000rpm 离心 1 分钟, 洗脱核酸。提取的高纯度 DNA/RNA 可直接用于下游相关实验或储存于 -85°C 至 -65°C 保存。

**注:** 可重新加入 20-50uL RNase-free Water 重复操作步骤 12 一遍, 合并两次洗脱液(如果需要核酸产量高); 或者使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱内, 重新洗脱一遍(如果需要核酸浓度高)。用户根据具体实验需要自行选择。

**注:** 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 核酸产量越高, 但是浓度将会降低。如果需要核酸浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小洗脱体积建议最好不少于 20uL, 体积过小会降低核酸洗脱效率, 减少核酸产量。

**注：**如果提取的游离 DNA，可以用灭菌 TE 缓冲液洗脱，对于长期保存效果更好。

**附录一：不同血浆/血清样品量推荐的试剂加入量**

样本体积	200uL	300uL	600uL	800uL	1000uL
溶液 ACL	160uL	240uL	480uL	640uL	800uL
溶液 ACB	360uL	540uL	1080uL	1440uL	1800uL
Proteinase K	20uL	30uL	60uL	80uL	100uL

**附录二：从尿液样品中提取游离循环核酸(DNA/RNA)**

1. 向 5mL 离心管中加入 63uL Proteinase K。
2. 加入 500uL 尿液样本。

**注：**当样品量超过 500uL 时，请按比例增加溶液 ACL、溶液 ACB 和 Proteinase K 试剂用量。

3. 加入 500uL 溶液 ACL 和 125uL 溶液 ATL，混匀，涡旋震荡混匀至少 30 秒。

**注：**溶液 ATL 最后加入，确保充分涡旋混匀。混匀时可能有沉淀产生，为正常现象，后续加热步骤会溶解，不影响产量。

4. 60℃ 孵育 30 分钟，其间颠倒混匀数次。
5. 加入 1.8mL 溶液 ACB(使用前检查是否加入异丙醇!)，涡旋震荡 15-30 秒混匀。
6. 冰浴 5 分钟，短暂离心，使管壁和壁盖上的液体集中到管底。
7. 接操作步骤 7 完成后续实验。

=====

