简石生物
GENSTONE BIOTECH

血清/血浆游离DNA提取试剂盒

（使用说明书 Ver.1.1.3）

产品亮点

- ✧ 可从10ml以内的血清/血浆，1ml以内的羊水或脑脊液中提取到高纯度的游离DNA。
- ✧ 获得的DNA产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等分子生物学实验。

产品货号：

TD476- 50（50次反应）

扫描二维码了解更多产品信息

目 录

产品组分 1

注意事项 1

产品特性 1

溶液制备 2

操作步骤 2

✧ 从≤5ml的样品中提取游离 DNA 2

✧ 负压操作步骤 2

✧ 离心操作步骤 3

✧ 从5-10ml的样品中提取游离DNA 3

组件查询 4

产品组分

试剂盒组成	50次	保存
蛋白酶K	4x125 mg	-20°C
蛋白酶K保存液	2 x14 ml	-20°C
SP消化液	2*32 ml	室温
SP DNA结合液	4*170 ml	室温
SP DNA洗涤液1	2*10ml	室温
SP DNA洗涤液2	2*12ml	室温
DNA洗脱液	10ml	室温
3号S纯化柱+15ml漏斗	25个*2	室温
2ml收集管	50个	室温

注意事项

- ✧ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ✧ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。
- ✧ 环境温度低时SP消化液或者SP DNA洗涤液1可能出现析出和沉淀，可以在37°C水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- ✧ 蛋白酶K及其保存液可常温运输。

产品特性

- ✧ **样品种类**:血清，血浆，羊水和脑脊液（CSF）。
- ✧ **处理的体积量**: 血浆- 单次离心：最多3ml；两次离心：最多10ml。
  血清- 最多10ml
  羊水- 最多1ml
  脑脊液- 最多1ml
- ✧ **DNA纯度**:获得的DNA产量高、纯度好，可以直接用于qPCR、高通量测序等各种分子生物学实验。
- ✧ **DNA回收情况**:回收的DNA≥100bp(本试剂盒针对无细胞游离DNA提取经过优化)，总量根据不同的样品个体差 异可能会比较大。一般从血清或血浆中提取到的DNA浓度在1-100ng/ml。
- ✧ **需要的仪器设备**:水浴锅或者金属浴（55°C）。微型离心机，负压多联器或立式离心机。

溶液制备

- ✧ 使用前需要添加6.5ml蛋白酶K保存液到蛋白酶K(125mg)里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。混匀之后放在-20°C保存。
- ✧ 使用前需要添加48ml95-100%的乙醇到12ml的**SP DNA洗涤液2**中。

操作步骤:

从≤5ml的样品中提取游离DNA

除非特殊说明，一般常温（15-30°C）进行以下操作步骤。

以下步骤以200μl血浆，血清或其他生物体液样品为例，当样品量发生变化的时候，只需要等比例的调整SP消化液，蛋白酶K和SP DNA结合液的用量就可以。

1. 添加50μl的SP消化液到每200μl的样品中，混匀。（具体按表格 1 比例添加试剂）。
2. 添加20μl的蛋白酶K到每200μl的样品中，混匀。（具体按表格 1 比例添加试剂）。
3. 在55°C下孵育30分钟。
4. 添加2倍体积的SP DNA结合液到步骤3中消化的样品中，混匀。

样品体积	200μl	1ml	3ml	5ml
SP消化液	50μl	250μl	750μl	1.25ml
蛋白酶K	20μl	100μl	300μl	500μl
混匀并且在55°C下孵育30分钟				
SP DNA结合液	540μl	2.7ml	8.1ml	13.5ml

表1

以下步骤可以通过真空负压的方式也可以通过离心的方式进行操作（负压设备所用真空多联器推荐简石生物公司产品）

负压操作步骤：

5. 确认3号S纯化柱套装（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在负压多联器上。
6. 倒入上述步骤4的混合液（含SP DNA结合液），打开真空开关使液体完全通过纯化柱。确保液体完全通过纯化柱并 且没有残留液体下流后，关闭真空泵并拔掉连接的15ml漏斗。

   步骤 7-8 也可使用台式离心机按以下方式操作
7. 关掉真空开关，倒入400μlSP DNA洗涤液1到纯化柱上，打开真空开关，让液体完全通过3号S纯化柱。
8. 关掉真空开关，加入700μlSP DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇!）到3号S纯化柱内，打开真空开关 让液体完全通过纯化柱。
9. 重复第8步。
10. 将3号S纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机上全速离心2分钟以去除残留乙醇。

11. 将3号S纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加50μl的DNA洗脱液到纯化柱基质上。（洗脱液事先在65-70°C水 浴中预热，洗脱效果更好），室温放置3分钟，在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱DNA。

离心操作步骤：

1. 确认3号S纯化柱（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里。
2. 倒入上述步骤4的混合液（含SP DNA结合液）10ml,在1，000xg离心力下离心2分钟，弃掉废液。重复此步骤 直到所有的混合液全部离心过纯化柱。
3. 拧开3号S纯化柱上面的橙色盖子，并将盖子和连接的15ml漏斗丢弃。
4. 将3号S纯化柱套在2ml收集管上，放到台式离心机内，添加400μlSP DNA洗涤液1到3号S纯化柱内，在1，000x g离心力下离心1分钟，弃废液。
5. 加入700μlSP DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇!）到3号S纯化柱内，在1，000xg离心力下离心 1分钟，弃掉废液。
6. 加入700μlSP DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇!）到3号S纯化柱内，全速离心1分钟去除乙醇残留。
7. 将3号S纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加≥50μl的DNA洗脱液到纯化柱基质上。（洗脱液事先在65-70°C水 浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱DNA。 注意：一般从血清、血浆中提取的DNA总量会比较低，不推荐使用Nanodrop进行检测。可以使用qPCR, Tapestation 或者 Qubit等进行DNA的定量。

从5-10ml的样品中提取游离DNA：

1. 添加250μl的SP消化液到每1ml的血清，血浆等生物体液中，混匀。（具体按表格 2 比例添加试剂）
2. 添加100μl的蛋白酶K到每1ml的血清，血浆等生物体液中，混匀。（具体按表格 2 比例添加试剂）
3. 在55°C下孵育30分钟。
4. 添加2倍体积的SP DNA结合液到步骤3中消化的样品中，混匀。

样品体积	1ml	6ml	8ml	10ml
SP消化液	250μl	1.5ml	2ml	2.5ml
蛋白酶K	100μl	600μl	800μl	1ml
混匀并且在55°C下孵育30分钟				
SP DNA结合液	2.7ml	16.2ml	21.6ml	27ml

表2

5. 确认3号S纯化柱（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里。
6. 倒入上述步骤4的混合液（含SP DNA结合液）10ml,在1，000xg离心力下离心2分钟，弃废液。重复此 步骤直到所有的混合液全部离心过纯化柱。
7. 拧开3号S纯化柱上面的橙色盖子，并将盖子和连接的15ml漏斗丢弃。
8. 将3号S纯化柱套在2ml收集管上，放到台式离心机内，添加400μlSP DNA洗涤液1到3号S纯化柱内，在1，000 x g离心力下离心1分钟，弃废液。

9. 加入700μl SP DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇!）到3号S纯化柱内，在1，000xg离心力下离心 1分钟，弃掉废液。
10. 加入700μl SP DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇!）到3号S纯化柱内，全速离心1分钟去除乙醇残 留。
11. 将3号S纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加≥50μl的DNA洗脱液到纯化柱基质上。（洗脱液事先在65-70°C水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱DNA。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
蛋白酶K	TD3001-2-F	125 mg	-20°C
蛋白酶K保存液	TD3001-2-E	14 ml	-20°C
SP 消化液	TD4076-1-32	32 ml	室温
SP DNA结合液	TD4076-2-170	170 ml	室温
SP DNA洗涤液1	TD4076-3-10	10ml	室温
SP DNA洗涤液2	TD4076-4-12	12ml	室温
DNA洗脱液	TD3004-4-10	10ml	室温
3号S纯化柱+15ml漏斗	TC1049-25	25个	室温
2ml收集管	TC1001-50	50个	室温