



CWhipro Circulating DNA Midi Kit

游离核酸DNA中量提取试剂盒（负压法）

目录号： CW2612S（10 preps）

CW2612M（50 preps）

保存条件： Spin Columns DG 2-8 °C，其他组分室温（15-30 °C）

产品内容

Component	CW2612S	CW2612M
	10 preps	50 preps
Buffer CL	45 mL	220 mL
Buffer CB (concentrate)	60 mL	300 mL
Buffer GTL	15 mL	60 mL
Buffer GW1 (concentrate)	3 mL	13 mL
Buffer GW2 (concentrate)	3 mL	15 mL
Buffer EBL	2 mL	10 mL
Proteinase K	100 mg	3×180 mg
Proteinase K Storage Buffer	5 mL	30 mL
Spin Columns DG	10	50
With Collection Tubes		
Tube Extenders (20 mL)	10	50
VacConnectors	10	50
Centrifuge Tubes (L-1.5 mL)	10	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻的血清、血浆、羊水、尿液等无细胞体液中提取游离DNA。本试剂盒采用可以特异性结合核酸的吸附柱和独特的缓冲液系统，样品裂解后，游离DNA在高盐条件下与硅胶膜结合，在低盐、高pH值时游离DNA从硅胶膜上洗脱下来。本试剂盒使用负压法，同时配备延伸管，可处理多达5 ml样本，纯化的DNA产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质污染。纯化得到的游离DNA质量稳定、可靠，可直接用于PCR、荧光定量PCR和二代测序等分子生物学实验。

自备试剂： 无水乙醇、异丙醇

实验前准备及重要注意事项

1. 向每管Proteinase K粉末中加入指定用量的Proteinase K Storage Buffer，使其完全溶解后-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。其它组分可以在干燥、室温（15-30℃）环境下稳定保存一年。如需保存更长时间，可置于2-8℃。

Cat. No.	CW2612S	CW2612M
Proteinase K Storage Buffer	5 mL	每瓶加入9 mL

2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。
3. 本试剂盒最多可以从5 mL血清血浆、4 mL尿液中提取cfDNA。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer CB中加入异丙醇，混合均匀，并在试剂瓶标签上做好标记。
5. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇，混合均匀，并在试剂瓶标签上做好标记。
6. 使用前请检查Buffer CL、Buffer CB是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer CL、Buffer CB于56℃水浴孵育重新溶解，混匀后使用。
7. 实验开始前将水浴锅预热至60℃。
8. 可将洗脱缓冲液Buffer EBL预热至60℃。
9. 负压装置。

操作步骤

血清、血浆样本（1-5mL）

1. 样品处理：

向离心管（自备）中加入1 mL 血清/血浆样本，若样本不足1 mL，加入PBS溶液补至1 mL 体积。

注意：当样品量超过1 mL时，请等比例增加Proteinase K、Buffer CL 和Buffer CB 试剂用量，具体试剂加入量可参考附表1。

2. 向以上溶液中加入100 μ L Proteinase K，混匀。

3. 加入800 μ L Buffer CL，剧烈震荡至少30秒。

4. 60 $^{\circ}$ C 孵育30分钟，其间颠倒混匀数次。

5. 加入1800 μ L Buffer CB（使用前检查是否加入异丙醇），颠倒混匀10次或剧烈震荡15-30秒。

6. 冰浴5分钟。

7. 正确连接负压装置，将连接管（VacConnectors）插到负压装置的插口上。

8. 将吸附柱（Spin Column DG）插入到连接管上。

9. 将延伸管（Tube Extenders）插入开盖的吸附柱中。

注意：确保连接管、吸附柱和延伸管连接稳固，防止发生漏液。

10. 将冰浴后的混合溶液全部加入延伸管中，开启并调节负压至-900~-800 mbar，缓慢吸走管中溶液。待溶液完全吸走，关闭负压开关，当压力恢复至0 mbar时，小心移去延伸管。

11. 向吸附柱中加入500 μ L Buffer GW1（使用前检查是否加入无水乙醇），开启并调节负压至-900~-800 mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

12. 向吸附柱中加入750 μ L Buffer GW2（使用前检查是否加入无水乙醇），开启并调节负压至-900~-800 mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

13. 向吸附柱中加入750 μ L 无水乙醇，开启并调节负压至-800~-900 mbar，待溶液完全吸走，关闭负压开关。

14. 当压力恢复至0 mbar时，将吸附柱取下，置于新的收集管（Collection Tube）中，12,000 rpm离心3分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应。

15. 将吸附柱置于新的1.5 mL离心管（Centrifuge Tube）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 20-150 μ L Buffer EBL，室温放置3分钟，12,000 rpm 离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

附表1：不同血清/血浆样本量推荐加入试剂量

样本体积 试剂加入量	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Proteinase K	100 μ L	200 μ L	300 μ L	400 μ L	500 μ L
Buffer CL	800 μ L	1.6 mL	2.4 mL	3.2 mL	4 mL
Buffer CB	1.8 mL	3.6 mL	5.4 mL	7.2 mL	9 mL

尿液样本 (1-4mL)

1. 样品处理:

向离心管(自备)中加入1 mL 尿液样本。若样本不足1 mL, 加入PBS溶液补至1 mL 体积。

注意: 当样品量超过1 mL 时, 请等比例增加 Proteinase K、Buffer GTL、Buffer CL 和 Buffer CB试剂用量, 具体试剂加入量可参考附表2。

2. 向以上溶液中加入125 μ L Proteinase K, 混匀。

3. 加入1 mL Buffer CL, 250 μ L Buffer GTL, 剧烈震荡至少30秒。

4. 60 $^{\circ}$ C 孵育30分钟, 其间颠倒混匀数次。

5. 加入3.6 mL Buffer CB(使用前检查是否加入异丙醇), 剧烈震荡15-30秒。

6. 冰浴5分钟。

7. 正确连接负压装置, 将连接管(VacConnectors)插到负压装置的插口上,

8. 将吸附柱(Spin Column DG)插入到连接管上。

9. 将延伸管(Tube Extenders)插入开盖的吸附柱中。

注意: 确保连接管、吸附柱和延伸管连接稳固, 防止发生漏液。

10. 将冰浴后的混合溶液全部加入延伸管中, 开启并调节负压至-900~-800 mbar, 缓慢吸走管中溶液。待溶液完全吸走, 关闭负压开关, 当压力恢复至0 mbar时, 小心移去延伸管。

11. 向吸附柱中加入500 μ L Buffer GW1(使用前检查是否加入无水乙醇), 开启并调节负压至-900~-800 mbar, 待溶液完全吸走, 关闭负压开关。

12. 向吸附柱中加入750 μ L Buffer GW2(使用前检查是否加入无水乙醇), 开启并调节负压至-900~-800 mbar, 待溶液完全吸走, 关闭负压开关。

13. 向吸附柱中加入750 μ L 无水乙醇, 开启并调节负压至-900~-800 mbar, 待溶液完全吸走, 关闭负压开关。

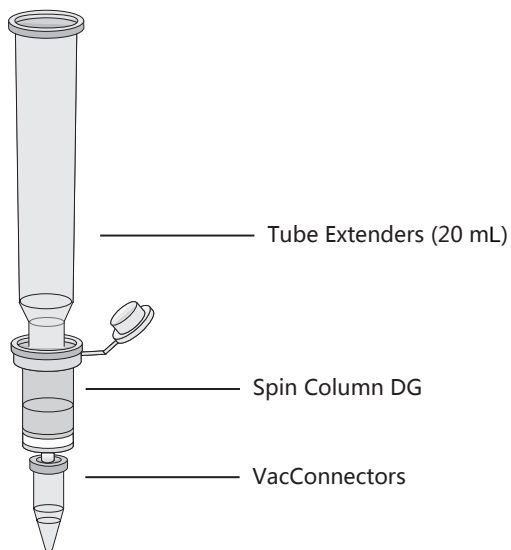
14. 当压力恢复至0 mbar时, 将吸附柱取下, 置于新的收集管(Collection Tube)中, 12,000 rpm 离心3分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应。

15. 将吸附柱置于新的1.5 mL 离心管(Centrifuge Tube)中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 20-150 μ L Buffer EBL, 室温放置3分钟, 12,000 rpm 离心1分钟, 收集DNA 溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存DNA。

附表2：不同尿液样本量推荐加入试剂量

样本体积 试剂加入量	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
Proteinase K	125 μ L	250 μ L	375 μ L	500 μ L
Buffer CL	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
Buffer GTL	250 μ L	500 μ L	750 μ L	1 mL
Buffer CB	3.6 mL	5.4 mL	7.2 mL	9 mL



Tube Extenders (20 mL)、Spin Column DG、VacConnectors连接示意图

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途