

**Blood(Serum/Plasma) Total DNA Extraction Kit****血液(血清/血浆)总 DNA 抽提试剂盒****说明书****【产品简介】**

游离循环核酸(Free circulating nucleic acids, 简称 cfDNA)是一种存在于动植物和人的体液中的细胞外游离状态核酸。目前已经在血浆、血清、尿液、前列腺液、支气管灌洗液、唾液、脑脊液、胃液、胆汁、淋巴液、腹腔液及粪便中检测到了游离循环核酸。已发现的游离循环核酸包括游离循环 DNA 和游离循环 RNA。游离型 DNA 在正常人血液中含量甚微, 甚至 13ng/ml[1], 而机体在一些特殊状态时(如患有肿瘤、自身免疫疾病、感染性疾病、中风、心肌梗死及妊娠等), 其含量明显上升, 比如恶性肿瘤平均值达到 180ng/ml[1].

本试剂盒采用独特的配方和添加剂, 能高效的分离血清、血浆及其它无细胞体液等样品中分离出游离的 DNA, 另外本试剂还可以有效地抑制各种外源性和内源性的 DNA 酶, 同时结合特制的纯化柱, 能最大限度的保持 DNA 的完整性、高得率以及纯度, 并能保留 DNA, 为需要进行 DNA 研究。

**【试剂盒组成】**

试剂盒组成	LG-0101A(50 次)	LG-0101B (100 次)
裂解液 LZ	60ml	120ml
漂洗液 WB	12ml	24ml
RNA 酶 A	500 $\mu$ l	1ml
洗脱液 EB	2 $\times$ 2ml	8ml
离心纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

**注意:** 1.使用前请在漂洗液 WB 加入适量无水乙醇。

2.低温情况下, 裂解液 LZ 有析出情况, 请将其室温放置, 待其完全溶解后使用。

3. 本试剂盒使用 DNA 吸附柱回收 DNA, 最小洗脱体积 30 $\mu$ l。

**【试剂运输及储存条件】**

试剂运输可在 2-8 $^{\circ}$ C 环境下进行。储存时, 裂解液 LZ 须置 4 $^{\circ}$ C 保存, 其余组分可保存在室温。

**【操作步骤】**

- 取 200-300 $\mu$ l 的血液(血清)样品, 加入 1ml 裂解液 LZ, 用移液器吹打数次混匀。
- 将裂解物转移至另一新的无 DNA 酶离心管中, 并加入 1.5 倍体积的无水乙醇, 用移液器吹打数次混匀。  
**注意:** 由于实验室常用 1.5ml 离心管, 建议裂解物可分成两管, 然后分别向其内加入 1.5 倍无水乙醇。
- 立即吸取 700 $\mu$ l 样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有 2ml 收集管的离心纯化柱, 轻盖盖子, 室温静置 2min。  
10,000 x g, 室温离心 15s, 弃尽废液。
- 将剩余的样品转移至离心柱, 重复第 3 步。并向离心柱中加入 10 $\mu$ l RNA 酶 A, 室温静置 5 分钟。
- 往离心柱中加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心 15s, 弃尽废液。  
**注意:** 第一次使用前请确认是否已经往 WB 中加入适量无水乙醇。
- 重复第 5 步, 往离心柱中加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心 15s, 弃尽废液。洗涤后 10,000 x g 离心空柱 2min 干燥硅胶膜。  
**注意:** 完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。
- 将离心柱转移至一新的无 DNA 酶的 1.5ml 离心管中, 往硅胶膜中央滴加洗脱液 EB, 轻盖管盖, 室温静置 5min, 11,000 x g 离心 1min 洗脱 DNA。  
**注意:** 洗脱体积不宜小于 30 $\mu$ l, 否则会影响洗脱效果。



8. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第7步洗脱。
9. 如需后续操作, 请始终将溶解的DNA至于冰上, 保存请置于-80℃。

### 【DNA质量判定】

**浓度判定:** 由于cfDNA正常人的血液中含量甚微, 平均值小于10ng/μl, 而当机体在一些特殊状态时(如患有肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病、中风、心肌梗死及妊娠等), 其含量明显上升。直接使用分光光度计进行测浓度及纯度时, 由于标本中的核酸含量较低, 超出了一般分光光度计的检测范围, 检测的浓度及纯度只作为参考。电泳鉴定时候, 需要使用高电压, 比如6-8V/cm 电泳15分钟。

**游离DNA的稳定性:** 对比了内源性和外源性DNA在体液中稳定性, 当外源性DNA加入血清中15s后, 99%不能进行扩增检测。然而, 未离心EDTA抗凝血浆4℃下分别放置0、6、24h, 内源性游离DNA浓度没有统计学意义的差别, 单一的冻融前后的血清DNA浓度也没有统计学意义的差别, 在未离心EDTA抗凝血浆4℃环境下和单一的冻融循环过程中游离DNA是稳定的。未离心的自凝血需要在6 h内分析完毕才能测定稳定的血清DNA浓度[4]。

### 【有效期】

本试剂盒有效期为12个月, 在有效期内使用。

**注:** 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

### 参考文献:

- [1] Michael S, Koprski, Floyd A, et al. Detection of tumor messenger DNA in the serum of Patients with Malignant Melanoma[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8):1961-1965
- [2] Wong SC, Lo SF, Cheung MT, et al. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients, Clin Cancer Res, 2004, 10(5):1613-1617
- [3] Biggiogera M, Bottone MC, Pellicciari C. Nuclear DNA is extruded from apoptotic cells[J]. J Histochem Cytochem, 1998, 46(9):999-1005
- [4] Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added DNA in blood specimens, serum, and plasma[J]. Clin Chem, 2002, 48(10):1647-1653