

QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook

试剂盒中包含：

QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	(50)
Catalog no.	55114
Number of preps	50
QIAGEN® Mini columns	50
Tube Extenders (20 ml)	2 x 25
Collection Tubes (2.0 ml)	50
Elution Tubes (1.5 ml)	50
VacConnectors	50
Buffer ACL*	220 ml
Buffer ACB* (concentrate)	300 ml
Buffer ACW1* (concentrate)	19 ml
Buffer ACW2 [†] (concentrate)	13 ml
Buffer AVE [†] (purple caps)	5 x 2 ml
QIAGEN Proteinase K	4 x 7 ml
Carrier RNA (red caps)	310 µg
Handbook	1

试剂盒保存方式：

- 收到试剂盒后，应将 QIAamp Mini columns 至于 2–8°C 保存，效期 1 年。室温 (15–25°C) 保存，效期 4 周。所有的 Buffer 室温(15–25°C)保存，效期 1 年。
- carrier RNA 冻干粉室温 (15–25°C)保存。Carrier RNA 只能溶解于 Buffer AVE，溶解后的 carrier RNA 应立即加入到 Buffer ACL (见 17 页的说明) 中。混合后的溶液应该现用现配，2–8°C 可以稳定 48 小时。未使用完的 carrier RNA (溶解于 Buffer AVE 中) 应冻存与–15 to –30°C。
- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 包含即用型的 proteinase K，溶解于特殊存储 buffer 中。收到试剂盒后，proteinase K 在室温(15–25°C)下可以稳定保存 1 年。如果需要延长保存时间，建议 2–8°C 保存。

客户需要自己准备的仪器和试剂：

在操作化学试剂时，请穿好实验服，戴好一次性手套和防护眼镜。其他安全须知，请遵照试剂生产厂家的要求操作。

所有的操作步骤都需要：

- 移液器 (可调整)
- 灭菌枪头(建议使用带有防尘阻隔的枪头避免交叉污染)
- 水浴设备，或者可以容纳 50 ml 离心管、加热温度可达 60°C 的加热模块
- 加热温度可达 56°C (可以容纳 2 ml 离心管)的加热模块
- 离心机
- 50 ml 离心管
- QIAvac 24 Plus 真空装置 (可选) (cat. no. 19413)
- QIAvac 连接系统(cat. no. 19419)或者可以替代的相关设备
- 真空泵(cat. no. 84010 [USA and Canada], 84000 [Japan], or 84020 [rest of world])
或者可以产生 -800 到-900 mbar 压力的真空泵
- 乙醇(96-100%)*
- 异丙醇(100%)
- 碎冰
- 稀释样品用的 PBS
- 可选：VacValves 阀门 (cat. no. 19408)
- 对于纯化尿液中的游离核酸或者 microRNA：另外需要 Buffer ATL (cat. no. 19076) (每个样品最多 1 ml)

注意事项：

溶液和试剂的准备：

Buffer ACB*：使用之前，加入 200 ml 的异丙醇(100%)到 300 ml 的 buffer ACB 浓缩液中，得到 500 ml Buffer ACB。加入异丙醇以后，混匀。

Buffer ACW1*：使用之前，加入 25 ml 乙醇(96–100%)到 19 ml buffer ACW1 浓缩液中，得到 44 ml Buffer ACW1. 加入乙醇以后，混匀。

Buffer ACW2：使用之前，加入 30 ml 乙醇(96–100%)到 13 ml buffer ACW2 浓缩液中，得到 43 ml Buffer ACW2.加入乙醇以后，混匀。

将 carrier RNA 加入到 Buffer ACL*中：加入 Carrier RNA 一般有 2 个作用：首先，可以加强核酸和 QIAamp Mini 膜的吸附，尤其是样品中的目标分子比较少见的情况下。另外，加入大量的 carrier RNA 可以降低 RNA 降解的几率，因为有时候，如果只是使用离液盐和 Buffer ACL，RNase 分子会降解不完全。

试剂盒中提供的干粉状的 carrier RNA 对于 Buffer ACL 是完全足够的。我们推荐的 carrier RNA 使用量可以按照 QIAamp Circulating Nucleic Acid 的操作步骤进行调整。这个操作步骤可以作为纯化多种核酸分子 RNA/DNA 的通用操作方法。

不同应用系统的纯化效率不同，主要取决于反应体系中总的核酸含量。这个试剂盒中洗脱出的核酸是包含游离核酸和我们外加入的 carrier RNA。多数情况下，我们加入的 carrier RNA 会超过游离核酸的量。因此，由于 carrier RNA 的存在，使用读取 UV 吸收值来定量游离核酸的量的方法是不准确的。那么，下游扩增时洗脱产物的使用量应该根据 carrier RNA 的加入量而定。

为了获得敏感度高的下游扩增反应，就需要降低 Buffer ACL 中加入的 carrier RNA 量。

对于使用 oligo dT 引物的扩增体系 (e.g.QIAGEN miScript System 定量 microRNAs)，不应该在纯化游离核酸的时候加入 carrier RNA。

在 310 µg 干粉状的 carrier RNA 中加入 1550 µl Buffer AVE*，获得 0.2 µg/µl 浓度的溶液。彻底溶解 carrier RNA，按照通常的用量进行分装，储存于 -15 到 -30°C。不要冻融 carrier RNA 超过 3 次。

请注意，carrier RNA 是不溶于 Buffer ACL，所以必须先溶于 Buffer AVE，然后再加入到 Buffer ACL 中。

Buffer ACL–carrier RNA 混合物的体积需要按照操作步骤中的表格，根据每批的样本量进行计算，选择同一批需要处理的样本量。反转离心管/瓶子 10 次，轻轻混匀。避免形成泡沫，不要涡旋。

请注意：在样品制备过程中，每个样品中最多使用 1 µg 的 carrier RNA 来优化操作。如果下游的扩增应用中，使用少量的 carrier RNA 会达到更好的效果，那么只需要将所需的 carrier RNA（溶解好的）加入到含有 Buffer ACL 的离心管中即可，每次加 5 µl 溶解的 carrier RNA 到 Buffer ACL 中。（每个样品中 carrier RNA 的使用量少于 1 µg 可能会对实验有帮助，但需要根据样本类型和经过下游的引物验证后再进行操作步骤的优化）

从纯化的核酸中去除 DNA：

如果下游应用需要从样本中去除 DNA，我们建议使用 RNase-free DNase Set (cat. no. 79254) 中的 DNase 处理最终的洗脱产物——见操作手册的 Appendix B (第 46 页)。如果在 DNase 处理后，需要进行回收，建议使用 RNeasy® MinElute® Cleanup Kit (cat. no. 74204)，按照操作手册的 Appendix C (第 47 页)。

纯化得到的 RNA 进行 RT-PCR 和 real-time RT-PCR，QIAGEN 有一系列优化好的、即用型的试剂盒，可以提供高特异性、敏感性的结果。详情请访问网站：

www.qiagen.com/PCR

使用 RT-PCR 分析和定量游离的 mRNA，我们建议使用 QuantiTect® Reverse Transcription Kit (cat. no. 205311，50 次反应) 来合成 cDNA，这个试剂盒是包含了 gDNA 去除步骤的。

操作步骤：从 1 ml, 2 ml, 3 ml 的血清/血浆中纯化游离核酸

此操作步骤是用于从 1 ml, 2 ml, 3 ml 的血清/血浆中纯化游离 DNA 和 RNA。如果样本体积在 4 ml, 5 ml，操作步骤见第 26 页的“Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 4 ml or 5 ml Serum or Plasma”。如果是从尿液样本中纯化游离 DNA 和 RNA，操作步骤见第 30 页的“Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 1 ml, 2 ml, or 3 ml of Urine”或者第 34 页的“Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 4

ml of Urine”。如果要纯化游离 RNA 和 miRNA，操作步骤见第 38 页的“Protocol: Purification of Circulating microRNA from 1 ml, 2 ml, or 3 ml Plasma, Serum, or Urine”。

实验前的注意事项：

- 操作步骤中的绿色表示样本体积为 1 ml 的血清/血浆；蓝色表示样本体积为 2 ml 的血清/血浆；红色表示样本体积为 3 ml 的血清/血浆。
- 所有的离心步骤都应该在室温(15–25°C)下进行。
- 如果需要使用到真空泵，在操作的步骤之间可以关闭真空泵，保证其密闭效果。

实验前的准备工作：

- 平衡样本至室温
- 如果样本体积<1 ml, <2 ml, <3 ml，使用 PBS 将体积补足 1 ml, 2 ml, 3 ml。
- 按照第 18–21 页的说明安装 QIAvac 24 Plus (如果有需要)。
- 预热水浴锅/加热模块 (可以放置第 4 步时需要的 50 ml 的离心管) 至 60°C。
- 预热加热模块 (可以放置第 14 步时需要的 2ml 的离心管) 至 56°C。
- 平衡 Buffer AVE 至室温，用于第 15 步的洗脱。
- 保证 Buffer ACB, Buffer ACW1, 和 Buffer ACW2 已经按照第 14 页的说明准备好了。
- 将重悬于 Buffer AVE 的 carrier RNA 按照第 14~15 页的表 2，加入到 Buffer ACL 中。

Table 2. Volumes of Buffer ACL and carrier RNA (dissolved in Buffer AVE) required for processing ■ 1 ml, ▲ 2 ml, or ● 3 ml samples

Number of samples	Buffer ACL (ml)			Carrier RNA in Buffer AVE (µl)
	■	▲	●	
1	0.9	1.8	2.6	5.6
2	1.8	3.5	5.3	11.3
3	2.6	5.3	7.9	16.9
4	3.5	7.0	10.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	28.1
6	5.3	10.6	15.8	33.8
7	6.2	12.3	18.5	39.4
8	7.0	14.1	21.1	45.0
9	7.9	15.8	23.8	50.6
10	8.8	17.6	26.4	56.3
11	9.7	19.4	29.0	61.9
12	10.6	21.1	31.7	67.5
13	11.4	22.9	34.3	73.1
14	12.3	24.6	37.0	78.8
15	13.2	26.4	39.6	84.4
16	14.1	28.2	42.2	90.0
17	15.0	29.9	44.9	95.6
18	15.8	31.7	47.5	101.3
19	16.7	33.4	50.2	106.9
20	17.6	35.2	52.8	112.5
21	18.5	37.0	55.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	123.8
23	20.2	40.5	60.7	129.4
24	21.1	42.2	63.4	135.0

操作步骤：

- 1、将 100 μ l , 200 μ l 或者 300 μ l QIAGEN Proteinase K 加入到 50 ml 的离心管中 (自备)。
- 2、再将 1 ml , 2 ml 或者 3 ml 的血清/血浆加入到 50 ml 的离心管中。
- 3、再加入 0.8 ml , 1.6 ml 或者 2.4 ml 的 Buffer ACL (含有 1.0 μ g carrier RNA)。盖上管盖，涡旋 30 s。为了有效地裂解，请确保可以在管中看到液体涡旋，样品和 Buffer ACL 彻底混匀才能形成均质化。

注意：在这一步的时候不要中断，立即进入步骤 4 进行裂解液的孵育过程。

- 4、60°C 孵育 30 min。
- 5、将离心管取回实验台，拧开管盖。
- 6、加入 1.8 ml、3.6 ml、5.4 ml 的 Buffer ACB 到离心管的裂解液中。盖上管盖，彻底涡旋 15–30 s。
- 7、将裂解液–Buffer ACB 的混合溶液在冰上孵育 5 min。
- 8、将 QIAamp Mini column 插入到 QIAvac 24 Plus 真空泵系统的 VacConnector 上，在 QIAamp Mini column 上放置 20 ml 的补充管。

保证补充管完全插入到 QIAamp Mini column 上，避免样品漏出。

注意：保刘收集管用于第 13 步的干燥操作。

- 9、小心地将第 7 步得到的裂解液–Buffer ACB 的混合液加入到在 QIAamp Mini column 上的补充管中，打开真空泵。当所有的裂解液完全通过柱子后，关掉真空泵，压力释放到 0 mbar。小心取下补充管，丢弃。

注意：大体积的样本(以 3ml 的样本来算，这一步大概有 11 ml 的液体)在真空泵的操作下，估计需要 10min 通过 QIAamp Mini 的膜。如果需要快速方便地释放真空压力，需要使用 Vacuum Regulator (QIAvac Connecting System 的一部分)。

为了避免交叉污染，在相邻的 QIAamp Mini Columns 间移动时务必小心操作。

10、将 600 μ l Buffer ACW1 加入到 QIAamp Mini column 中，保持柱子是打开状态，打开真空泵。在所有的 Buffer ACW1 完全通过了 QIAamp Mini column 后，关掉真空泵，压力释放为 0 mbar。

11、将 750 μ l Buffer ACW2 加入到 QIAamp Mini column 中，保持柱子是打开状态，打开真空泵。在所有的 Buffer ACW2 完全通过了 QIAamp Mini column 后，关掉真空泵，压力释放为 0 mbar。

12、将 750 μ l 的乙醇(96–100%) 加入到 QIAamp Mini column 中，保持柱子是打开状态，打开真空泵。在所有的乙醇完全通过了 QIAamp Mini column 后，关掉真空泵，压力释放为 0 mbar。

13、关闭上 QIAamp Mini column，从真空泵上取下，弃 VacConnector。将 QIAamp Mini column 放置在一个干净的 2 ml 收集管中，全速(20,000 x g; 14,000 rpm)离心 3 min。

14、将 QIAamp Mini Column 置于一个 2 ml 收集管中，打开 盖子，56°C 孵育 10 min 使膜完全干燥。

15、将 QIAamp Mini column 置于一个干净的 1.5 ml 洗脱管(试剂盒中提供)，弃第 14 步的 2 ml 收集管。小心地将 20–150 μ l 的 Buffer AVE 加入到 QIAamp Mini 膜中央，盖上盖子，室温孵育 3 min。

注意：保证 buffer AVE 已经平衡至室温(15–25°C)。如果洗脱液体积比较小(<50 μ l)，那么应该将洗脱液加入到膜中央，保证能完全洗脱结合的 DNA。洗脱体积是可以根据下游的不同应用进行调整的，回收的洗脱体积应该比加入柱子的体积小 5 μ l 左右。

16、全速(20,000 x g; 14,000 rpm)离心 1 min，洗脱核酸。