

2019 年 9 月

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit 使用说明（手册）

第 1 版



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

修订版 4 MAT

1118364ZHCN

Sample to Insight



内容物

预期用途	4
摘要和说明	4
操作流程原理	5
样本体积	5
裂解样本	7
吸附到 QIAamp Mini 离心柱	7
去除残留污染物	7
纯化核酸的洗脱	7
核酸的产量和大小	8
操作方案说明	9
提供的材料	10
试剂盒内容物	10
需要而未提供的材料	11
警告和预防措施	12
试剂的存放与处理	14
试样的存放与处理	15
操作流程	16
缓冲液和试剂的制备	22
Breeze 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸	24
Classic 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸	29
质量控制	34
局限性	34

符号.....	35
参考.....	37
联系信息.....	37
故障排除向导.....	38
附录 A: 血浆分离和存放建议.....	40
附录 B: 有关 RNA 处理的一般说明.....	41
订购信息.....	42
手册修订历史.....	43

预期用途

QIAamp DSP Circulating NA Kit 是采用硅胶膜技术（QIAamp 技术）从人血浆样本中分离和纯化循环中的游离 DNA 和 RNA 的系统。

该产品旨在供专业用户使用，例如，在分子生物技术方面经过培训的技术员和医师。

QIAamp DSP Circulating NA Kit 旨在用于体外诊断。

摘要和说明

游离循环核酸在人血浆中以短小片段的形式存在，通常 < 1000 bp (DNA)、< 1000 nt (RNA) 或小到 20 nt (miRNA)。人血浆中的游离循环核酸的浓度通常较低，且在人血样本中的浓度差异很大，浓度范围为 1-100 ng / ml (1-5)。

QIAamp DSP Circulating NA Kit 可从人血浆中高效纯化循环核酸。血浆样本既可以是新鲜样本也可以是冰冻样本。由于 QIAvac 24 Plus 上采用了延长管和真空处理，您可采用的样本起始容积最大可为 5 ml，且可采用灵活的洗脱体积 (20 - 150 μ l)，从而实现对低浓度核酸的浓缩。

洗脱所得的游离循环基因组 DNA 或 RNA 可直接用于下游应用或存放。采用 QIAamp DSP Circulating NA Kit 可有效去除蛋白质、核酸酶和其他杂质。

操作流程原理

QIAamp DSP Circulating NA 操作流程由 4 个步骤（裂解、结合、洗涤和洗脱）组成，可在 QIAvac 系统上使用 QIAamp Mini 离心柱进行。该操作流程具有稳健性，可最大程度地减少样本间的交叉污染，并可增进用户在处理潜在感染性样本时的安全性。

该操作流程简洁实用，可让您在不到 2 小时的时间内同时处理多达 24 个样本。

样本体积

QIAamp Mini 离心柱可结合短至 20 nt 的核酸片段，产量取决于样本体积和样本中循环核酸的浓度（血浆浓度通常为 1 - 100 ng/ml）。该 QIAamp DSP Circulating NA Kit 操作流程经过优化，可处理体积最大为 5 ml 的样本。

QIAamp DSP
Circulating NA Kit 操作

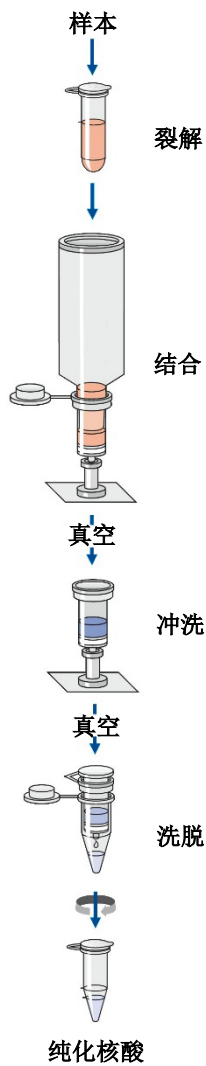


图 1. QIAamp DSP Circulating NA Kit 操作流程概要

裂解样本

生物体液中的游离循环核酸通常与蛋白质结合存在或包被在囊泡中，因此，为了使这些核酸被释放出来以便与 QIAamp Mini 离心柱进行选择结合，就需要有效的裂解步骤。为此，需采用高温高度变性条件，在蛋白酶 K 和 Buffer ACL 的作用（确保 Dnase 和 Rnase 失活）下，裂解样本，使核酸从其结合蛋白、脂质和囊泡中释放出来。

吸附到 QIAamp Mini 离心柱

为了优化循环核酸与膜的结合，可通过向裂解液中加入 Buffer ACB 来调节结合条件。随后，裂解物被转移至 QIAamp Mini 柱，并在真空抽吸作用下通过硅胶膜，而该较大体积裂解物中的循环核酸则被吸附到硅胶膜上。特定的盐和 pH 条件可确保对 PCR 和其他下游酶促反应有抑制作用的大部分蛋白及其他污染物不会滞留在 QIAamp Mini 膜上。

该操作方案需用到可产生 - 800 至 - 900 mbar 真空压力的真空歧管（如与 QIAvac Connecting System 配套的 QIAvac 24 Plus）和真空泵（如 QIAGEN® Vacuum Pump）。为了能够方便地进行真空压力监控和真空释放，还应采用 Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System 中的部件）。

去除残留污染物

通过 3 道冲洗步骤，污染物可被有效去除，而核酸仍将结合在膜上。

纯化核酸的洗脱

使用 Buffer AVE 执行洗脱。仅需一步，高纯度的循环核酸就可洗脱入平衡至室温的 Buffer AVE 中。可灵活采用 50-150 μ l 的洗脱体积。如需更高的核酸浓度，则洗脱体积可降至最小 20 μ l。洗脱体积低于 50 μ l 可使核酸浓度更高，但也可能会使总产量下降。

回收的洗脱物体积最多可施加到离心柱的洗脱缓冲液体积少 5 μ l。

核酸的产量和大小

从生物样本中分离出来的游离循环核酸的产量通常低于 1 µg，因此很难用分光光度计测定。使用 QIAamp DSP Circulating NA Kit 从样本中获得的循环 DNA 和 RNA 的绝对产量在来自不同个体的样本之间存在差异，并且还取决于其他因素（例如某些疾病状态）。此外，提取的核酸中的载体 RNA 可能会主导 UV 吸光值读数（请参见第 22 页）。建议使用定量扩增法来确定产量。

使用 QIAamp DSP Circulating NA Kit 纯化的循环核酸的大小分布可通过琼脂糖凝胶电泳或结合靶标特异性标记探针⁵或微流体电泳解决方案（例如 Agilent Bioanalyzer）来确定。

操作方案说明

本手册中提供了两种不同的操作方案。

“**Breeze** 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸”（第 24 页）适用于处理最多 5 ml 血浆（按 1 ml 增减），并经过优化，以减少动手及周转时间。

“**Classic** 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸”（第 29 页）适用于处理最多 5 ml 血浆（按 1 ml 增减），原封继承了《QIAamp DSP circulating NA Kit 手册》修订版 3 (R3) 中的操作方案。

提供的材料

试剂盒内容物

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
目录编号			61504
制备数			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini 离心柱及 2 ml 冲洗管)	COL	50
EXT	Column Extenders (20 ml 离心柱扩展器)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (2 ml 冲洗管)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (1.5 ml 洗脱管)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (离心管连接器)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (裂解缓冲液) *	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (结合缓冲液) * (浓缩液)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (冲洗缓冲液 1) * (浓缩液)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (冲洗缓冲液 2) † (浓缩液)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE‡	Elution Buffer (洗脱缓冲液) † (紫帽)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN 蛋白酶 K)	PROTK	4 x 7 ml
Carrier (载体)	Carrier RNA (载体 RNA) (红帽)	CAR RNA	310 µg
	手册	H B	1

* 包含高离液盐。警告和预防措施，见第 12 页。

† 含作为防腐剂的叠氮钠。

需要而未提供的材料

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

确保根据制造商的建议对仪器进行检查和校准。

用于所有操作方案

- 移液器（可调）
- 无菌移液器吸头（建议使用带有气溶胶屏障的移液器吸头以防止交叉污染）
- 可放置 50 ml 离心管并可将温度保持在 56° C 或 60° C 的水浴池或加热块 *
- 可放置 2 ml 冲洗管并可将温度保持在 56° C 的加热块或类似装置（对 Classic 操作方案而言）*
- 微型离心机（转子可容纳 2 ml 试管）*
- 50 ml 离心管
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold（目录编号 19413）
- QIAvac Connecting System（目录编号 19419）或同等产品
- 真空泵（目录编号 84010 [美国和加拿大]、84000 [日本]或 84020 [世界其他地区]）或能够产生 - 800 至 - 900 mbar 真空压力的等效泵
- 乙醇 (96 - 100%)†
- 异丙醇 (100%)
- 碎冰（仅对“Classic 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸”而言）。
- 有些样本可能需要用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 稀释
- 可选：VacValves（目录编号 19408）


* 确保根据制造商的建议对仪器进行检查和校准。

† 请勿使用变性乙醇，其中包含甲醇或乙酰酮等其他物质。

警告和预防措施

供体外诊断使用

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参阅相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。它们可在 www.qiagen.com/safety 网页上找到，格式为 PDF 压缩文件。您还能在该网页上查找、浏览、打印每一种 QIAGEN 试剂盒及其成分的 SDS。

	<p>警告 人身伤害风险</p> <p>不得将漂白剂或酸性溶液直接添加到样本制备产生的废弃物中。</p>
---	--

Buffer ACL、Buffer ACB 和 Buffer ACW1 中含有盐酸胍，与漂白剂混合时会形成高活性化合物。

如果含有这些缓冲液的液体泼洒出来，请使用合适的实验室清洁剂和水进行清理。如果泼洒的液体中含有潜在传染性病原体，请首先使用实验室清洁剂和水清洁受影响区域，然后使用 1% (v/v) 次氯酸钠进行清洁。

以下危险和预防声明适用于 QIAamp DSP Circulating NA Kit 的组件。

Buffer ACB



含有：硫氰酸胍。危险！吞食有害。接触皮肤或吸入可能造成伤害。导致严重皮肤灼伤和眼损伤。对水生生物有持久伤害。与酸接触会释放高毒性的气体。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

Buffer ACL



含有：硫氰酸胍。危险！吞食有害。接触皮肤或吸入可能造成伤害。导致严重皮肤灼伤和眼损伤。对水生生物有持久伤害。与酸接触会释放高毒性的气体。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

Buffer ACW1



含有：盐酸胍。警告！吞食或吸入有害。导致皮肤瘙痒。导致严重眼刺激。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。

Proteinase K



包含：蛋白酶 K。危险！导致轻度皮肤瘙痒。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘/烟尘/煤气/雾气/蒸汽/喷雾。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用品。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将人员移到空气新鲜的地方，保持舒适顺畅的呼吸。

试剂的存放与处理

QIAamp Mini 离心柱应在 2 - 8° C 下干燥保存。所有缓冲液应在室温 (15 - 25° C) 下保存。在这些条件下保存时，QIAamp Mini 谱柱在失效日期之前不会发生性能降低。

冻干的载体 RNA 可在室温 (15 - 25° C) 环境下保存至试剂盒上的失效日期。应将载体 RNA 溶解在 Buffer AVE 中：如 Breeze 操作方案第 25 页和 Classic 操作方案第 30 页所述，溶解后的 RNA 应被立即加入到 Buffer ACL 中。该溶液应该是新制备的，最多可在 2 - 8° C 环境下稳定存放 48 小时。应将未使用的溶解在 Buffer AVE 中的载体 RNA 分成等分试样并放入 -30° C 至 -15° C 环境下冷冻存放。

QIAamp DSP Circulating NA Kit 中含有即用型蛋白酶 K 溶液，该溶液溶解在特殊配制的存储缓冲液中。该蛋白酶 K 试剂可在室温 (15 - 25° C) 下保存至该组件标签注明的失效日期。

试样的存放与处理

血液的存放与处理

为避免游离核酸的降解和核酸从细胞释放，我们建议全血样本（例如 EDTA 样本）在 2 - 8° C 下的存放时间不应超过 6 小时。如果采用的是稳定化采血管，请参考制造商提供的储存条件。我们建议您结合您的具体下游应用和靶标的情况综合查验这些储存条件的适用性。

血浆的存放与处理

当采用 EDTA 作为抗凝剂时，建议在血样采集后立即进行血浆分离和核酸分离，尤其是对于 RNA 下游应用而言。就短期存放而言，血浆可在 2-8° C 下存放 24 小时。

如需存放更长时间，源自稳定化和非稳定化采血管的血浆等分试样均可在 -20° C（靶标仅为 DNA）或 -80° C（靶标为 DNA 和 RNA）下存放至少 4 周。

核酸洗脱物的存放

核酸洗脱物采用 1.5 ml 洗脱管（提供）收集。纯化的循环核酸可在 2 - 8° C 下最长存放 24 小时。如果存放时间需超出 24 小时，对于 DNA 下游应用，建议将循环核酸在 -30 至 -15° C 下存放；对于 RNA 下游应用，建议将其在 -90 至 -60° C 下存放。

操作流程

前期重要工作

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus 经过专门设计，可快速、高效地并行处理多达 24 个 QIAGEN 离心柱。样本及冲洗液在真空压力——而非离心力——作用下通过离心柱膜，从而提高了纯化过程的速度并减少了动手时间。

在与 QIAvac Connecting System 联用时，QIAvac 24 Plus 可作为流过物收集系统使用。样本流过物可被收集在单独的废液瓶中。

有关 QIAvac 24 Plus 的维护，请参阅《QIAvac 24 Plus 手册》中的处理指南。

在 QIAvac 24 Plus 上处理 QIAamp Mini 离心柱

在 QIAvac 24 Plus 上处理 QIAamp Mini 离心柱时需用到一次性 VacConnector 和可重复使用的 VacValve。可将 VacValve（可选）直接插入 QIAvac 24 Plus 歧管的鲁尔插槽中并确保流速的稳定，以便可更好地并行处理不同的样本量。在样本流速明显不同的情况下，为确保真空稳定，应该采用 VacValve。VacConnector 是一次性连接器，可安装在 QIAamp Mini 离心柱和 VacValve 之间或 QIAamp Mini 离心柱与 QIAvac 24 Plus 的鲁尔插槽之间。这样做可防止纯化过程中离心柱和 VacValve 之间发生直接接触，从而可避免样本间发生交叉污染。VacConnector 在用完一次后应丢弃。由于溶液量较大，因此需要采用 QIAvac Connecting System（或用废液瓶组建类似装置）（请参见图 2）。

QIAvac 24 Plus 处理指南

- 始终将 QIAvac 24 Plus 放在安全的工作台上或工作区内。如果掉落，QIAvac 24 Plus 歧管可能会破裂。
- 存放 QIAvac 24 Plus 时，应始终保持 QIAvac 24 Plus 的清洁、干燥。有关清洁操作流程，请参见《QIAvac 24 Plus 手册》。
- QIAvac 24 Plus 的组件对某些溶剂（表 1）不耐受。如果 QIAvac 24 Plus 被这些溶剂溅到，请用水彻底冲洗之。
- 为确保性能稳定，请勿对 QIAvac 24 Plus 歧管的任何部分施用硅树脂或真空润滑脂。
- 在施以压力的真空歧管附近工作时，请务必谨慎小心并戴安全眼镜。
- 如需获取有关备件或替换零件的信息，请与 QIAGEN 技术服务部或您的本地经销商联系。
- 真空压力是指真空歧管内部压力与大气压力之间的压差（标准大气压为 1013 mbar 或 760 mm Hg）。真空压力可使用 QIAvac Connecting System 进行测定（请参见图 2）。本手册中的操作方案将需要使用可产生 -800 至 -900 mbar 压力的真空泵（例如 QIAGEN Vacuum Pump）。务必避免使用更高的真空压力。使用低于建议值的真空压力可能会导致核酸产量和纯度下降，并可增大膜堵塞风险。

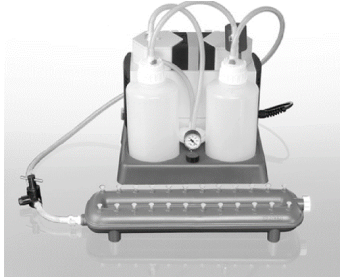


图 2. QIAvac 24 Plus、QIAvac Connecting System 及 Vacuum Pump

表 1. QIAvac 24 Plus 的化学物质耐受性

可耐受		不可耐受
醋酸	离液盐	苯
铬酸	高浓度酒精	苯酚
SDS	氯化钠	氯仿
Tween® 20	尿素	甲苯
氯漂白剂	盐酸	醚类
氢氧化钠		

QIAvac 24 Plus vacuum manifold 的设置

1. 将 QIAvac 24 Plus 连接到真空源。如果使用 QIAvac Connecting System，按《QIAvac 24 Plus 手册》所述将该系统连接到歧管和真空源。
2. 将一个 VacValve 插入到 QIAvac 24 Plus 上的每个待用鲁尔插槽中（见图 3）。用鲁尔插头封闭未使用的鲁尔插槽或关闭插入的 VacValve。

在样本流速明显不同的情况下，为确保真空稳定，应采用 VacValve。

3. 将一个 VacConnector 插入到每一个 VacValve（见图 3）。

在开始纯化前直接执行此步骤以避免暴露 VacConnector 暴露到空气中接触潜在污染物。

4. 将 QIAamp Mini 离心柱放入歧管上 VacConnector 中（见图 3）。

提示：将泡罩包装中冲洗管放起来，以供在纯化步骤中使用。

5. 向每一个 QIAamp Mini 离心柱中插入一个离心柱扩展器（20 ml）图 3）。

提示：确保将离心柱扩展器牢固地插入到 QIAamp Mini 离心柱中，以防止发生样本泄漏。

6. 对于核酸纯化，请遵循本手册所述方案中的说明。使用完毕后丢弃 VacConnector。

让 QIAamp Mini 离心柱的盖子保持打开状态，并施加真空。

在步骤之间关闭真空，以确保处理过程中施用的真空压力的一致性。如需加快真空释放速度，应使用 Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System 的部件）。

提示：每个 VacValve 在样本全部从离心柱流过后都可单独关闭，因此，您可并行处理不同体积或粘度的样本。

7. 样本处理完毕后，请清洁 QIAvac 24 Plus（见《QIAvac 24 Plus 手册》中的“QIAvac 24 Plus 的清洁与去污”）

提示： Buffer ACL、ACB 和 ACW1 与含漂白剂的消毒剂不兼容。警告和预防措施，见第 12 页。

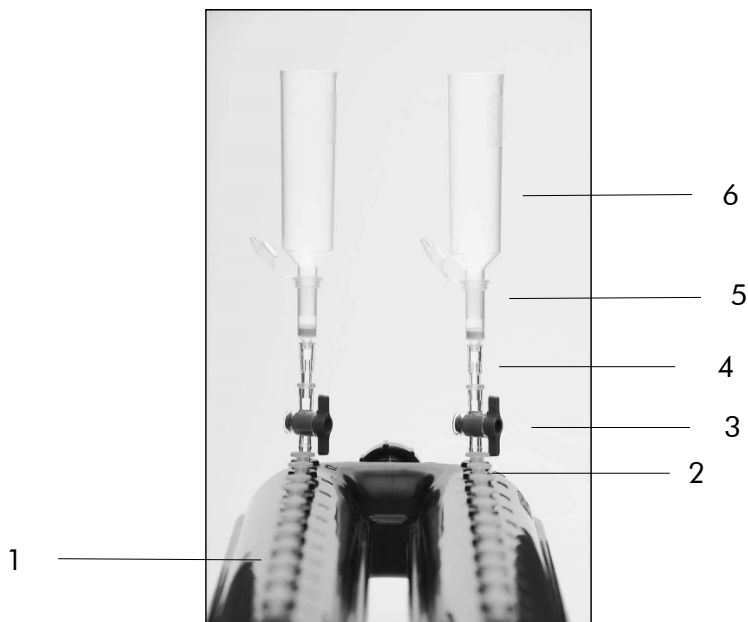
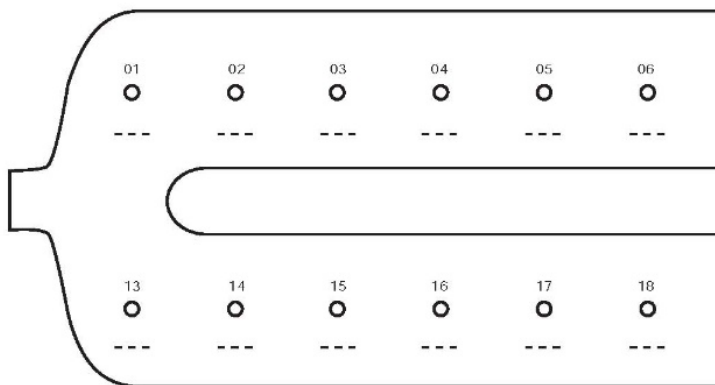


图 3. 使用 QIAamp Mini 离心柱、VacValve、VacConnector 和 离心柱扩展器 设置 QIAvac 24 Plus。

- | | |
|---------------------------------------|-------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 QIAvac 24 Plus 上的鲁尔插槽
(可用鲁尔插塞封闭) | 5 QIAamp Mini 离心柱 |
| 3 VacValve** | 6 离心柱扩展器 |

为防止样本混淆，我们建议根据图 4 中的方案对用于 QIAvac 24 Plus 真空系统的试管和 QIAamp Mini 离心柱进行标记。您可复印该图，并在上面标记样本名称。

* 必须单独购买。



日期: _____

操作员: _____

运行 ID: _____

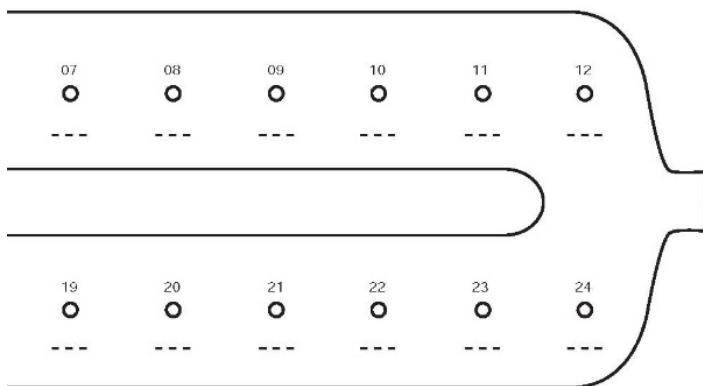


图 4. 用于 QIAvac 24 Plus 真空系统的试管和 QIAamp Mini 离心柱标记方案。

缓冲液和试剂的制备

Buffer ACB

向 300 ml Buffer ACB 浓缩液中加入 200 ml 异丙醇 (100%)，制成 500 ml Buffer ACB，以备使用。加入异丙醇后充分混合。

Buffer ACW1 *

向 19 ml Buffer ACW1 浓缩液中加入 25 ml 乙醇 (96 - 100%)，制成 44 ml Buffer ACW1，以备使用。加入乙醇后充分混合。

Buffer ACW2 †

向 13 ml Buffer ACW2 浓缩液中加入 30 ml 乙醇 (96 - 100%)，制成 43 ml Buffer ACW2，以备使用。加入乙醇后充分混合。

将载体 RNA 添加到 Buffer ACL *

载体 RNA 具有两种作用：其一，它能增强核酸与 QIAamp Mini 膜的结合，尤其在样本中的靶标分子非常稀少的情况下。其二，在出现 RNase 分子未在 Buffer ACL 中的离液盐和清洁剂作用下发生变性的罕见情况下，加入载体 RNA 可降低 RNA 的降解几率。

提供的冻干载体 RNA 的量足以满足与试剂盒随附提供的 Buffer ACL 配合使用时的所需量。载体 RNA 的推荐浓度经过调试，以使 QIAamp DSP Circulating NA 操作方案可作为与许多不同扩增系统兼容的通用纯化系统，并可对各种 RNA 和 DNA 靶标适用。

不同扩增系统的效率不一，具体取决于反应液中存在的核酸总量。源自该试剂盒的洗脱物同时包含循环核酸和载体 RNA，并且载体 RNA 的量远超循环核酸的量。因此，采用 UV 吸光

* 含有高离液盐。警告和注意事项，请见第 12 页。

† 含作为防腐剂的叠氮钠。

度读数法对分离的循环核酸进行量化是不足取的，因为这种方法的测定结果是由存在的载体 RNA 决定的。

要让扩增反应具有最高的灵敏度，可能需要减少添加到 Buffer ACL 中的载体 RNA 量。

对于涉及寡 dT 引物的扩增系统，在分离游离循环核酸时不应添加载体 RNA。

向含有 310 µg 冻干载体 RNA 的试管中加入 1550 µl Buffer AVE*，获得浓度为 0.2 µg/µl 的溶液。使载体 RNA 彻底溶解，并根据需要将其分成若干等分试样，然后将等分试样在 -30° C 至 -15° C 环境下存放。对载体 RNA 的冻融次数不得超过 3 次。

请注意，载体 RNA 无法溶解于 Buffer ACL。必须先将其溶解在 Buffer AVE 中，然后再加入到 Buffer ACL 中。

根据操作方案中的表格计算出每批样本所需的 Buffer ACL - 载体 RNA 混合物的量。选择要同时处理的样本数。

将试管或溶液瓶颠倒 10 次进行轻轻混合。为避免起泡沫，避免以涡旋方式混合。

提示：该样本制备操作流程经过优化，每个样本最多可加入 1.0 µg 载体 RNA。如果事实证明减少载体 RNA 更适合您的扩增系统，则您应仅将所需量的溶解载体 RNA 转移至含有 Buffer ACL 的试管。对于每次制备中需要的每微克载体 RNA，应将 5 µl 溶解载体 RNA 加入到 Buffer ACL 中。（对每个样本使用少于 1.0 µg 的载体 RNA 可能会效果更好，应就此根据具体样本类型和下游检测进行验证。）

*含作为防腐剂的叠氮钠。

Breeze 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸

该操作方案适用于从 1 至 5 ml 人血浆中纯化循环 DNA 和 RNA，并经过优化以缩短动手时间和周转时间。有关《QIAamp DSP circulating Kit 手册》第 1 版/修订版 3 的现有经用户验证的工作流程，请参阅“Classic 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸”（第 29 页）。

前期重要工作

- 所有离心步骤都是在室温 (15 - 25° C) 环境下进行的。
- 在步骤之间关闭真空，以确保方案步骤中施用的真空压力的一致性。
- **提示：**真空泵产生的压力应介于 - 800 至 - 900 mbar 之间。
- 将样本平衡到室温。
- 使用磷酸盐缓冲生理盐水将样本的体积调整到最接近的精确体积（1 ml 至 5 ml）。
- 按照第 18 页上的说明设置 QIAvac 24 Plus。
- 将水浴池或加热块加热到 56° C，以备在第 3 步中加热 50 ml 离心管时使用。
- 使用前，将 QIAamp Mini 离心柱置于室温下平衡至少 1 小时。
- 确保 Buffer ACB、Buffer ACW1 和 Buffer ACW2 根据第 22 页上的说明制备完毕（加入了异丙醇或乙醇）。
- 根据第 2 页的说明，将溶解在 Buffer AVE 中的载体 RNA 加入到 Buffer ACL。

表 2. 处理 1-5 ml 人血浆样本所需的 Buffer ACL 和载体 RNA（溶于 Buffer AVE）的体积

按血浆毫升数的设定	A	B	C	D	E	溶于 Buffer AVE 的载体 RNA (μl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
样本数量	Buffer ACL (ml)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

操作流程：Breeze 操作方案

1. 依次将 QIAGEN Proteinase K、血浆和 Buffer ACL 移入 50 ml 离心管（未提供）中。

设定	A	B	C	D	E
ProtK (μl)	100	200	300	400	500
血浆 (ml)	1	2	3	4	5
ACL (IU/ml)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. 盖上管盖，脉冲涡旋混合 5 次，每次 2 秒钟。

确保管中形成可见的涡流。为确保有效裂解，请务必将样本和 Buffer ACL 充分混合，以产生均质的溶液。

提示：此时，请勿中断工作操作流程。应立即进行第 3 步，开始进行裂解孵育。

3. 在 56° C (±1° C) 下孵育 15 (±1) 分钟。
4. 将试管放回实验室工作台上，旋开管盖。
5. 向装有裂解物的试管中加入 Buffer ACB。根据第 1 步中的设定选择加入的体积。

设定	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. 盖上管盖，采用脉冲涡旋充分混合 5 次，每次 2 秒钟。

确保管中形成可见的涡流。为确保有效裂解，请务必将裂解物和 Buffer ACB 充分混合，以产生均质的溶液。

7. 将试管中的裂解物-Buffer ACB 混合物放在室温下孵育 5 (±1) 分钟。
8. 将 QIAamp Mini 离心柱插入 QIAvac 24 Plus 上的 VacConnector 中（见第 18 页的 QIAvac 24 Plus vacuum manifold 的设置）。将 20 ml 离心柱扩展器插入到打开的 QIAamp Mini 离心柱中。

确保将离心柱扩展器牢固地插入到 QIAamp Mini 离心柱中，以防止发生样本泄漏。

提示：保留冲洗管，以供用于第 13 步中进行干燥离心。

9. 小心地将第 7 步中的裂解物加入到 QIAamp Mini 离心柱上的离心柱扩展器中。打开真空泵。当离心柱中的裂解物被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。小心地摘下并丢弃离心柱扩展器。

请注意，如果样本裂解物体积较大（起始样本体积为 5 ml 时，裂解物体积约为 18 ml），则裂解物在真空作用力下通过 QIAamp Mini 膜的时间可能会长达 20 分钟。

如需更快、更方便地释放真空，应使用 Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System 的部件）。

提示：为避免交叉污染，在摘下离心柱扩展器时，请注意不要触及邻近的 QIAamp Mini 离心柱。

10. 将 600 μ l Buffer ACW1 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当 QIAamp Mini 离心柱中的 Buffer ACW1 被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
11. 将 750 μ l Buffer ACW2 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当 QIAamp Mini 离心柱中的 Buffer ACW2 被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
12. 将 750 μ l 乙醇 (96 - 100%) 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当离心柱中的乙醇被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
13. 关闭 QIAamp Mini 离心柱的盖子。将离心柱从真空歧管中取出，并丢弃 VacConnector。将 QIAamp Mini 离心柱放入干净的 2 ml 冲洗管中（来自第 8 步），并以全速（20,000 \times g; 14,000 rpm）离心 3 (\pm 0.5) 分钟。
14. 将 QIAamp Mini 离心柱放入新的 2 ml 冲洗管中。打开离心柱的盖子，将该套组放在室温下孵育 3 分钟，以便使膜完全变干。
15. 将 QIAamp Mini 离心柱放入干净的 1.5 ml 冲洗管 (提供) 中，并丢弃第 14 步中的 2 ml 冲洗管。小心地将 20 - 150 μ l Buffer AVE 放到 QIAamp Mini 柱薄膜的中心盖上盖子，然后在室温环境下孵育 3 (\pm 0.5) 分钟。

重要提示： 确保 Buffer AVE 已平衡至室温 (15–25° C) 如果采用的洗脱体积较小 (<50 μ l)，则洗脱缓冲液必须被加到膜的中心部位，以便洗脱全部的核酸。

洗脱体积可灵活掌握，可根据下游应用的要求进行调整。

采用较小体积的 Buffer AVE 进行洗脱可使核酸浓度更高，但也可能会使总产量下降。

回收的洗脱物体积最多比施加到 QIAamp Mini 离心柱膜的洗脱液体积小 5 μ l。

提示： 如果预期 RNA 产量较低，则推荐在洗脱时采用低吸附试管（未提供）。

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

Classic 操作方案：从 1-5 ml 人血浆中纯化循环核酸

该操作方案是《QIAamp DSP circulating NA Kit 手册》修订版 3 (R3) 中的原封方案，可与针对 1-5 ml 人血浆的现有经用户验证的工作流程配合使用。

前期重要工作

- 所有离心步骤都是在室温 (15 - 25° C) 环境下进行的。
- 在步骤之间关闭真空，以确保方案步骤中施用的真空压力的一致性。
提示： 真空泵产生的压力应介于 - 800 至 - 900 mbar 之间。
- 将样本平衡到室温。
- 使用磷酸盐缓冲生理盐水将样本的体积调整到最接近的精确体积 (1 ml 至 5 ml)。
- 按照第 18 页上的说明设置 QIAvac 24 Plus。
- 将水浴池或加热块加热到 60° C，以备在第 3 步中加热 50 ml 离心管时使用。
- 将加热块加热到 56° C，以备在第 14 步中加热 2 ml 冲洗管时使用。
- 使用前，将 QIAamp Mini 离心柱置于室温下平衡至少 1 小时。
- 确保 Buffer ACB、Buffer ACW1 和 Buffer ACW2 根据第 22 页上的说明制备完毕 (加入了异丙醇或乙醇)。
- 根据第 表 3 页的说明，将溶解在 Buffer AVE 中的载体 RNA 加入到 Buffer ACL。

表 3. 处理 1-5 ml 人血浆样本所需的 Buffer ACL 和载体 RNA（溶于 Buffer AVE）的体积

按血浆毫升数的设定	A	B	C	D	E	溶于 Buffer AVE 的载体 RNA (μl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
样本数量	Buffer ACL (ml)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

操作流程：Classic 操作方案

1. 依次将 QIAGEN Proteinase K、血浆和 Buffer ACL 移入 50 ml 离心管（未提供）中。

设定	A	B	C	D	E
ProtK (μl)	100	200	300	400	500
血浆 (ml)	1	2	3	4	5
ACL (IU/ml)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. 盖上管盖，脉冲涡旋混合 30 秒钟。

确保管中形成可见的涡流。为确保有效裂解，请务必将样本和 Buffer ACL 充分混合，以产生均质的溶液。

提示：此时，请勿中断工作操作流程。应立即进行第 3 步，开始进行裂解孵育。

3. 在 60° C (±1° C) 下孵育 30 (±2) 分钟。
4. 将试管放回实验室工作台上，旋开管盖。
5. 向装有裂解物的试管中加入 Buffer ACB。根据第 1 步中的设定选择加入的体积。

设定	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. 盖上管盖，采用脉冲涡旋充分混合 30 秒钟。

确保管中形成可见的涡流。为确保有效裂解，请务必将裂解物和 Buffer ACB 充分混合，以产生均质的溶液。

7. 将试管中的裂解物-Buffer ACB 混合物放在冰上孵育 5 (±1) 分钟。
8. 将 QIAamp Mini 离心柱插入 QIAvac 24 Plus 上的 VacConnector 中（见第 18 页的 QIAvac 24 Plus vacuum manifold 的设置）。将 20 ml 离心柱扩展器插入到打开的 QIAamp Mini 离心柱中。

确保将离心柱扩展器牢固地插入到 QIAamp Mini 离心柱中，以防止发生样本泄漏。

提示：保留冲洗管，以供用于第 13 步中进行干燥离心。

- 小心地将第 7 步中的裂解物加入到 QIAamp Mini 离心柱上的离心柱扩展器中。接通真空泵，施加 -800 至 -900 mbar 的压力。当离心柱中的裂解物被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。小心地摘下并丢弃离心柱扩展器。

请注意，如果样本裂解物体积较大（起始样本体积为 5 ml 时，裂解物体积约为 18 ml），则裂解物在真空作用力下通过 QIAamp Mini 膜的时间可能会长达 20 分钟。

如需更快、更方便地释放真空，应使用 Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System 的部件）。

提示：为避免交叉污染，在摘下离心柱扩展器时，请注意不要触及邻近的 QIAamp Mini 离心柱。

- 将 600 μ l Buffer ACW1 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当 QIAamp Mini 离心柱中的 Buffer ACW1 被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
- 将 750 μ l Buffer ACW2 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当 QIAamp Mini 离心柱中的 Buffer ACW2 被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
- 将 750 μ l 乙醇 (96 - 100%) 加入 QIAamp Mini 离心柱。让离心柱的盖子保持打开状态，然后打开真空泵。当离心柱中的乙醇被全部吸出后，关闭真空泵并释放压力至 0 mbar。
- 关闭 QIAamp Mini 离心柱的盖子。将离心柱从真空歧管中取出，并丢弃 VacConnector。将 QIAamp Mini 离心柱放入干净的 2 ml 冲洗管中（来自第 8 步），并以全速（20,000 x g; 14,000 rpm）离心 3 (\pm 0.5) 分钟。
- 将 QIAamp Mini 离心柱放入新的 2 ml 冲洗管中。打开离心柱的盖子，将该套组放在 56° C (\pm 1° C) 下孵育 10 (\pm 1) 分钟，以便使膜完全变干。
- 将 QIAamp Mini 离心柱放入干净的 1.5 ml 冲洗管 (提供) 中，并丢弃第 13 步中的 2 ml 冲洗管。小心地将 20 - 150 μ l Buffer AVE 放到 QIAamp Mini 柱薄膜的中心盖上盖子，然后在室温环境下孵育 3 (\pm 0.5) 分钟。

重要提示：确保 Buffer AVE 已平衡至室温 (15 - 25° C) 如果采用的洗脱体积较小 (<50 μ l)，则洗脱缓冲液必须被加到膜的中心部位，以便洗脱全部的核酸。

洗脱体积可灵活掌握，可根据下游应用的要求进行调整。

采用较小体积的 **Buffer AVE** 进行洗脱可使核酸浓度更高，但也可能会使总产量下降。

回收的洗脱物体积最多比施加到 **QIAamp Mini** 离心柱的洗脱液体积小 5 μl 。

提示：如果预期 RNA 产量较低，则推荐在洗脱时采用低吸附试管（未提供）。

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

质量控制

QIAGEN 根据 ISO 认证的质量管理体系，以预先确定的规格参数为参照，测试每批 QIAamp DSP Circulating NA Kit 以确保产品品质始终如一。

局限性

该系统的游离循环核酸的分离性能是通过使用源自以下采血管的血液制成的人血浆样本建立的：

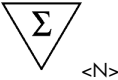












- K2-EDTA (Beckton Dickinson, 目录编号 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, 目录编号 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, 目录编号 218962)













用户负责针对其实验室中使用的、不在 QIAGEN 性能研究的涵盖范围内的任何操作流程验证系统性能。

为了将对于诊断结果的负面影响风险最小化，应该对下游应用进行足够的控制。为了进一步验证，建议参考国际协调会议 (ICH) 在《ICH Q2 (R1) 分析操作程序验证：文本和方法》中列出的有关技术要求的指南。

产生的任何诊断结果必须结合其他临床或实验结论来解读。

符号

符号	符号定义
	包含足够进行 <N> 次测试的试剂
	用于
	体外诊断医疗仪器
	到达时
	运输时打开：将 QIAamp Mini 离心柱存放在 2 - 8° C 环境中
	目录编号
	数量
	批号
	材料编号
	成分
	容量
	添加
	温度限制

	制造商
	参考使用说明
	在瓶中添加乙醇后记录当前日期
	乙醇
	在瓶中添加异丙醇后记录当前日期
	异丙醇
	包含
	造成的后果
	硫氰酸胍
	盐酸胍
	BRIJ 58
	全球贸易项目编号

参考

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. 56, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

联系信息

关于技术支持和更多信息，请访问 support.qiagen.com 上的技术支持中心，或致电 QIAGEN 技术服务部或当地经销商（参见封底或访问 www.qiagen.com）。

故障排除向导

故障排除向导能帮助解决可能出现的任何问题。有关联系信息，请参阅底盖或访问 www.qiagen.com。

意见和建议

洗脱物中几乎没有或没有核酸

- | | |
|---|--|
| a) 使用了非稳定化血浆 | 样本为非稳定化血浆样本时，其 DNA 降解可能会加速。我们建议遵循 CEN/TS 16835-3:2015 进行操作。使用新样本重复纯化操作流程。 |
| b) 从抽血到血浆制备的间隔时间过长 | 有核血细胞可能会发生降解并将基因组 DNA 释放到血浆中，从而对靶标核酸造成稀释。 |
| c) 样本冻融一次以上 | 应避免反复冻融，因为这可能导致 DNA 降解。始终使用新鲜样本或仅融化一次的样本。 |
| d) 样本中靶标 DNA 浓度低 | 血浆样本在室温下放置时间过长。使用新样本重复纯化操作流程。
注意： 某些个体的血浆中的游离 DNA 浓度可能较低；这时，应选用较大的样本体积和较小的洗脱物体积。 |
| e) Buffer ACL 中的样本裂解效率低 | QIAGEN Proteinase K 如果被长时间置于高温下，则可能会失去活性。使用新样本和新鲜的 QIAGEN Proteinase K 重复纯化操作流程。 |
| f) Buffer ACL - 载体 RNA 混合物未充分混合 | 轻轻颠倒装有 Buffer ACL - 载体 RNA 混合物的试管至少 10 次以使 Buffer ACL 与载体 RNA 充分混合。 |
| g) 使用的乙醇不是 96-100% 乙醇，而是低浓度的乙醇 | 使用新样本和 96-100% 乙醇重复纯化操作流程。请勿使用变性乙醇，其中包含甲醇或乙酰酮等其他物质。 |
| h) Buffer ACB 制备不当 | 检查向 Buffer ACB 浓缩液中加入的异丙醇（不是乙醇，见第 22 页）的体积是否正确。 |
| i) Buffer ACW1 或 Buffer ACW2 制备不当 | 检查稀释 Buffer ACW1 和 Buffer ACW2 浓缩液时使用的乙醇的体积是否正确（见第 22 页）。使用新样本重复纯化操作流程。 |
| j) 制备 Buffer ACW1 或 Buffer ACW2 时采用了 70% 乙醇 | 检查稀释 Buffer ACW1 和 Buffer ACW2 浓缩液时使用的乙醇是否为 96 - 100% 乙醇（见第 22 页）。使用新样本重复纯化操作流程。 |

DNA 或 RNA 在下游酶促反应中表现不佳

- | | |
|--------------------|--|
| a) 洗脱物中几乎没有或没有 DNA | 潜在原因，请参见前面的“洗脱物中几乎没有或没有核酸”一节。如果可能，增加加入到反应中的洗脱物的体积。 |
| b) 采用的洗脱体积不当 | 确定适合您的下游应用的最大洗脱物体积。相应地减少或增加加入到下游应用的洗脱物的体积。洗脱体积可按比例调整。
提示： 采用较小体积的 Buffer AVE 进行洗脱可使核酸浓度更高，但也可能会使总产量下降。 |
| c) 缓冲液未充分混合 | Buffer ACW2 中的盐和乙醇成分可能会因两次使用之间的静置时间过长而分离。每次使用前，请务必彻底混合缓冲液。 |
| d) 受到载体 RNA 的干扰 | 如果洗脱液中的载体 RNA 的存在干扰了下游的酶促反应，则可能有必要减少载体 RNA 用量或将其完全省略。 |

意见和建议

一般处理

- a) QIAamp Mini 离心柱堵塞
- 如果液流速度减慢，抽空的时间可延长。
- 或者，关闭 VacValve（如果使用），并小心地从 QIAamp Mini 离心柱上卸下离心柱扩展器 - VacConnector - VacValve 套组，同时确保不丢失离心柱扩展器中的任何裂解物。
- 从真空歧管上取下 QIAamp Mini 离心柱，将其放入 2 ml 冲洗管中，并全速离心，直到样本全部通过离心柱膜为止。更换装有剩余裂解物的离心柱扩展器 - VacConnector - VacValve 套组。打开真空泵，打开 VacValve，然后继续加载剩余的裂解物。
- 如果 QIAamp Mini 离心柱继续堵塞，请重复上述步骤。
- 由于反复冻融，血浆中可能形成了冷沉淀物。这些沉淀物可能会堵塞 QIAamp Mini 离心柱。请勿使用冻融超过一次的血浆。
- 如果目视可见冷沉淀，应以 16,000 x g 离心 5 分钟以澄清样本。
- b) 可变的洗脱体积
- 样本的不同会对最终的洗脱液体积造成影响。回收的洗脱物体积最多比施加到 QIAamp Mini 离心柱的洗脱液体积小 5 µl。
- c) 未达到 -800 至 -900 mbar 的真空压力
- 真空歧管未完全关闭。打开真空后，按住真空歧管的盖子。检查真空压力是否达到。
- QIAvac 盖的垫圈存在磨损。目视检查歧管的密封件，必要时进行更换。
- 真空阀已磨损。摘除所有 VacValve，然后将 VacConnector 直接插入鲁尔接头。将 QIAamp Mini 离心柱插入 VacConnector 中，关闭离心柱盖，然后打开真空。检查真空压力是否达到。必要时更换 VacValve。
- 与真空泵间的连接件泄漏。用鲁尔帽盖上所有鲁尔接头，并打开真空泵。在真空泵打开后（Vacuum Regulator 阀处于关闭状态），检查真空压力是否稳定。如有必要，更换泵和真空歧管之间的连接件。
- 如果真空压力仍未达到，请换用另一台功率更大的真空泵。

附录 A：血浆分离和存放建议

对于稳定化采血管（例如 PAXgene ccfDNA 试管或 Streck-Free DNA 试管），请按照制造商的说明进行血浆分离和存放。我们建议您结合您的具体下游应用和靶标的情况综合查验这些储存条件的适用性。

对于非稳定化采血管，我们建议遵循 CEN/TS 16835-3:2015。

我们建议遵循以下操作方案来从血液中分离游离循环核酸，该方案包括一个高 g 值离心步骤以去除细胞碎片，从而降低样本中的细胞或基因组 DNA 和 RNA 的含量。

1. 将装在 BD Vacutainer® 管（或其他以 EDTA 作为抗凝剂的原始采血管）中的 EDTA 血样放入冷却至 4°C 的带有摆平转子和适宜挂杯的离心机中。
2. 在 4°C 下以 1900 x g（3000 rpm）离心血样 10 分钟。
3. 小心地吸出血浆上清液，注意不要扰乱血浆与细胞间的交界层。从一个 10 ml 的原始采血管中可获得约 4 - 5 ml 的血浆。

提示：在此阶段获得的血浆已经可用于循环核酸提取。然而，随后的高速离心将可更进一步地去除细胞碎片，并去除源自受损有核细胞的基因组 DNA 和 RNA 对循环核酸造成的污染。

4. 将血浆吸出并转移到新的离心管中。
5. 在 4°C 下以 16,000 x g（在固定角转子中）离心血浆样本 10 分钟。
这将能够进一步去除附着在细胞碎片上的细胞源核酸。
6. 小心地将上清液吸出并转移到新的试管中，注意不要扰乱沉淀物。
7. 如果血浆将在同一天被用于核酸提取，请将其在 2 - 8°C 下存放，直至进一步处理。如需存放更长的时间，源自稳定化和非稳定化采血管的血浆等分试样均可在 -20°C（靶标为 DNA）或 -80°C（靶标为 RNA）下存放至少 4 周。在使用血浆进行循环核酸提取之前，请在室温下解冻血浆试管。

8. **可选：**以 16,000 x g（在固定角转子中）离心血浆样本 5 分钟以去除冷沉淀。

可选：将上清液转移到新管中，然后开始执行循环核酸提取操作方案。

附录 B: 有关 RNA 处理的一般说明

RNA 处理

核糖核酸酶 (RNase) 是一种非常稳定且活跃的酶类, 其作用功能的发挥一般不需要辅助因子。由于核糖核酸酶难以灭活, 且只需微量便足以摧毁 RNA, 因此, 在使用任何塑料制品或玻璃器具之前, 请务必先消除可能存在的核糖核酸酶污染。应非常小心地避免在纯化操作流程之中或之后在不经意间将 RNase 引入 RNA 样本。要创造并保持无核糖核酸酶环境, 在处理 RNA 时, 在一次性和非一次性容器和溶液的预处理和使用期间必须采取下列预防措施。

一般处理

处理 RNA 时始终采用正确的微生物、无菌技术。手和尘粒能携带细菌和霉菌, 且是最常见的 RNase 污染源。处理试剂和 RNA 样本时始终佩戴乳胶或塑料手套, 以避免来自皮肤表面或多尘实验室设备的 RNase 污染。频繁更换手套并尽可能始终保持试管封闭。在为下游应用进行等分试样移液时, 应将纯化的 RNA 置于冰上保存。

一次性塑料制品

建议在整个操作流程中使用无菌的一次性聚丙烯试管。

订购信息

产品名称	内容物	目录编号
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	可用于 50 次制备：QIAamp Mini 离心柱、离心柱扩展器、VacConnectors、QIAGEN Proteinase K、试剂、缓冲液和收集管	61504
配件		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	真空歧管，可处理 1-24 个离心柱：QIAvac 24 Plus vacuum manifold、鲁尔插塞和快拆管接头	19413
Vacuum Pump*	通用真空泵	84010 [美国和加拿大] 84000 [日本] 84020 [世界其他地区]
QIAvac Connecting System*	真空歧管与真空泵之间的连接件，其中包括：托盘、废液瓶、连接管、管接头、阀、量表和 24 个 VacValve。	19419

* 供执行真空操作方案时使用。

有关设备许可的相关最新信息以及产品的特定免责声明，请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒手册或用户手册。QIAGEN 试剂盒手册和用户手册可从 www.qiagen.com 或 QIAGEN 技术服务部以及您当地的经销商联系处取得。

手册修订历史

日期	更改
修订版 4 09/2019	将预期用途更改为仅供从人血浆纯化游离核酸使用。添加了“Breeze”操作方案。未加入有关尿液和 miRNA 的方案。 安全信息更新。

QIAamp DSP Circulating NA Kit 的有限许可协议

使用本产品表示本产品的任何购买者或使用者同意遵循如下条款：

1. 本产品在使用时只能遵守本产品随附的操作方案和本手册，且只能与试剂盒内包含的组件协同使用。除了本产品随附的操作方案、本手册以及 www.qiagen.com 上提供的其他操作方案中所述的情况，QIAGEN 并未在其任何知识产权下许可将本试剂盒的所含组件与本试剂盒中未包含的任何组件协同使用或者整合。其中一些附加操作方案可能是由 QIAGEN 用户为 QIAGEN 用户提供的。这些操作方案未经 QIAGEN 彻底测试或优化。QIAGEN 既不对其进行担保，也不保证其没有侵犯第三方的权利。
2. 除非相关许可明确说明，否则 QIAGEN 并不保证本试剂盒和/或其使用不会侵犯第三方的权利。
3. 本试剂盒及其组件为一次性用品，不可重复使用、翻新或转卖。
4. 除了明确陈述的许可外，QIAGEN 否认提供任何其他明示或暗示许可。
5. 本试剂盒的购买者和使用者同意不采取、也不允许其他人采取任何步骤来实施或推动实施以上禁止的任何行为。为行使本“有限许可协议”条款的规定内容或者保护本试剂盒和/或其组件的知识产权，QIAGEN 可能会在法庭上执行本协议的相关禁令，并追讨所有调查和诉讼费用（包括律师费）。

如需获得更新的许可条款，请访问 www.qiagen.com。

商标：QIAGEN®、Sample to Insight®、QIAamp® (QIAGEN Group)，BD Vacutainer® (Becton、Dickinson and Company)，Tween® (ICI Americas Inc.)。本文档中使用的注册名称、商标等，甚至在有专门如此标记时，也不得视为不受法律保护。

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN，保留所有权利。

