天净沙系列

CAT#:230228

常温运输和保存，含低温成分

天净沙

eccDNA 纯化试剂盒（测序级，以粗提 eccDNA 为起始材料）

eccDNA Purification Kit

使用手册 V0.51

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是测序级的以粗提 eccDNA 为起始材料的 eccDNA 纯化试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户不用自己开发专用的试剂盒。
2. 能有效分离 eccDNA 和非 eccDNA。
3. 跟后续的酶切电泳，核酸扩增等研究兼容。
4. 采用酶切去除人线粒体 DNA，降低其对 eccDNA 分析的干扰。
5. 本试剂盒足够 50 次 eccDNA 纯化实验。
6. 本产品只能用于科研，不能用于临床。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
去蛋白溶液 A	230222f	50 mL	100 mL 棕玻瓶
去蛋白溶液 B	230222g	50 mL	100 mL 棕玻瓶
微量核酸沉淀剂 V2.0（无生物源性）	221231	200 mL	250 mL 本色瓶
10×人 mtDNA 内切酶缓冲液	230222h	1 mL	1.5 mL 绿盖管
人 mtDNA 内切酶	230222i	50 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	230228sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，230222h 和 230222i 为低温成分，需-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

eccDNA 粗提液、TE 缓冲液，超纯水，75%乙醇。

使用方法

一、实验前样品准备

1. 用自选方法获得 eccDNA 粗提液，取 2 mL eccDNA 粗提液平均分到 4 个 1.5 mL 塑料管中。

二、eccDNA 粗提液去蛋白

2. 在上述 eccDNA 粗提液中，分别加入 0.2 mL 去蛋白溶液 A，再涡旋震荡 2 分钟。
3. 常温 13000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中。
4. 再加入 0.2 mL 去蛋白溶液 B，再涡旋震荡 2 分钟。
5. 常温 13000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中。
6. 在上清中加入 0.9 mL 的微量核酸沉淀剂 V2.0（需要颠倒混匀后取用），颠倒混

匀，常温 13000×g 离心 15 分钟，小心弃上清后加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次，常温 13000×g 离心 3 分钟，小心弃上清后短暂离心 30 秒。去掉残留的液体（约 50 μL）。

7. 在室温下以 13000×g 离心 0.5 分钟，弃上清液。
8. 加入 50 μL 超纯水，吹打重悬，汇集在一起得到 eccDNA 再提液 200 μL，用 NanoDrop 或 PicoGreen 法 DNA 定量试剂盒测试 eccDNA 再提液浓度。取 20 μL eccDNA 再提液留样，作为后续实验的对照。

三、线粒体 DNA 酶切

注意：本步只限人线粒体 DNA。如果用生物信息学的手段排除线粒体 DNA 对测序数据的干扰，可以跳过此步。eccDNA 不是从人细胞提取的也可以跳过此步。

9. 在一个 PCR 管中设置如下反应：

成分	加入量
10×人 mtDNA 内切酶缓冲液	20 μL
eccDNA 再提液	180 μL
人 mtDNA 内切酶	1 μL

10. 37℃保温 4 小时。
11. 加入 0.2 mL 去蛋白溶液 A，再涡旋震荡 2 分钟。
12. 常温 13000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中.
13. 再加入 0.2 mL 去蛋白溶液 B，再涡旋震荡 2 分钟。
14. 常温 13000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中。
15. 在上清中加入 0.2 mL 的微量核酸沉淀剂 V2.0（需要颠倒混匀后取用），颠倒混匀，常温 13,000×g 离心 15 分钟，小心弃上清后加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次，常温 13,000×g 离心 3 分钟，小心弃上清后短暂离心 30 秒。去掉残留的液体。
16. 加入 50 μL TE 缓冲液，吹打溶解沉淀，得到 eccDNA 精提液。用 NanoDrop 或 PicoGreen 法测试所得 eccDNA 的浓度。eccDNA 精提液可用于后续各种实验。

四、去除人线粒体 DNA 效果检测

17. 可以用自备的线粒体 PCR 试剂盒，以 eccDNA 再提液留样和 eccDNA 精提液为模板进行扩增，检测去除线粒体 DNA 的效果。本试剂盒不含人线粒体 DNA 检测试剂盒，用户需要另外购买。本步也可以跳过。

关联产品	包埋法 eccDNA 纯化及扩增试剂盒

20250811ztl-wjw