

宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法) 机装版说明书

货号：1104191

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒(磁珠法)机装版用于生物制品样品的前处理,可稳定高效地获得样品中的微量宿主细胞 DNA。本试剂盒适用于多种基质缓冲溶液,有效提取纯化微量的 DNA。可与各个 SHENTEK® 宿主细胞(CHO、E.coli、Vero、酵母、NS0、Human、MDCK、Sf9&AcNPV、Hi5&AcNPV、质粒、SV40LTA&EIA 等)DNA qPCR 检测试剂盒配合使用。

本试剂盒配合 rHCDpurify® 前处理系统可以实现样品的自动处理。在 rHCDpurify® 中已内置相应处理程序,只需一键操作即可完成前处理。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	洗涤液 A	NND014	30 mL×1 瓶	室温
	结合液	NND016	20 mL×1 瓶	室温
	洗脱液	NND018	10 mL×1 瓶	室温
	稀释液	NND021	10 mL×1 瓶	室温
	蛋白酶 K 缓冲液	NND026	10 mL×1 瓶	室温
II	磁珠	NND030	750 μL×2 管	2-8°C
III	蛋白酶 K	NND023	500 μL×2 管	-18°C及以下
	糖原	NND035	500 μL×2 管	-18°C及以下
	酵母 tRNA	NND037	50 μL×1 管	-18°C及以下

■ 规格

100 Extractions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月,具体详见试剂盒标签。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

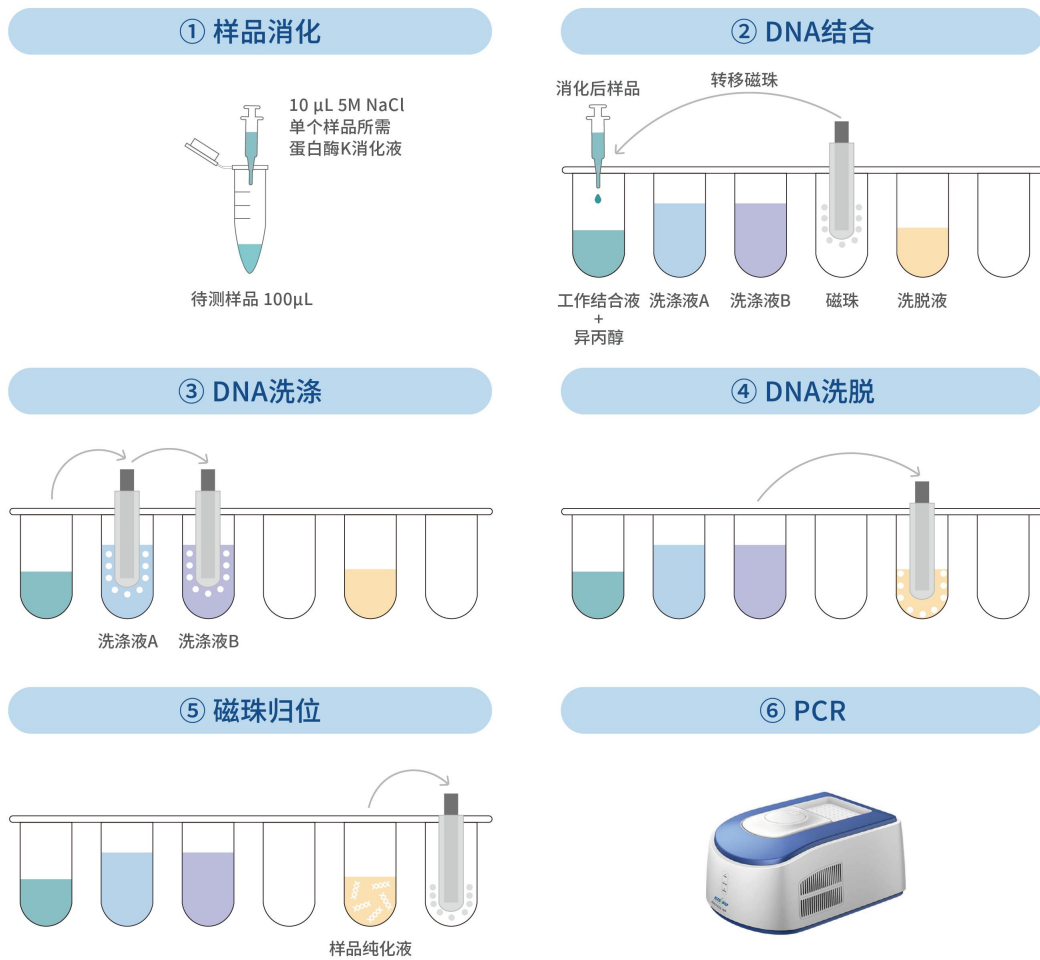
➤ 无水乙醇(分析纯)

- 100%异丙醇（分析纯）
- 1M 的 HCl 和 NaOH
- 5M 的 NaCl
- PBS 缓冲液: 1×、pH 7.4、无钙离子和镁离子（如有必要，可用于稀释样品）
- 一次性手套
- PCR 八联管或 96 孔板，相应管盖或覆膜
- 1000 μL ，100 μL ，10 μL 低吸附滤芯枪头
- 1.5 mL 低吸附离心管

■ 相关设备

- 迷你离心机
- rHCDpurify®前处理系统
- 漩涡振荡器
- 恒温金属浴
- 1000 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪
- 96 深孔板及套管
- 荧光定量 PCR 仪
- 超净台
- 96 孔微孔板混匀仪

■ 实验操作流程



一、试剂、仪器准备

开启新试剂盒时需完成以下工作:

- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 40 mL 的无水乙醇。
- 在干净的试剂瓶中用无水乙醇和灭菌超纯水配制 70%乙醇溶液, 标记为**洗涤液 B**。
- 配制后的洗涤液应密封, 室温保存, 防止乙醇挥发(注意使用效期)。

每次实验前需预先完成以下工作:

- 准备好 100%的异丙醇。
- 准备好水浴温度, 55 °C、70 °C。
- 蛋白酶 K 消化液配制:
- ✚ 使用前若发现蛋白酶 K 缓冲液出现结晶或沉淀, 应 37 °C金属浴处理, 待完全溶解后, 振荡混匀。

- ✚ 单个样品所需蛋白酶 K 消化液的准备（蛋白酶 K 使用量根据样品蛋白浓度可酌情增加）：

样品蛋白浓度	蛋白酶 K ($\mu\text{L}/\text{样品}$)	蛋白酶 K 缓冲液 ($\mu\text{L}/\text{样品}$)
0-100 mg/mL	10	100
100-200 mg/mL	20	100

- ✚ 按照上述单个样品的蛋白酶 K 消化液用量和样品数，计算和配制本次实验所需的蛋白酶 K 消化液总体积。

- ✚ 蛋白酶 K 消化的完全程度会影响 DNA 的回收检测。

➤ 工作结合液配制：

- ✚ 使用前若发现结合液出现结晶或沉淀，应 37 °C 金属浴处理，待完全溶解后，振荡混匀。

- ✚ 单个样品工作结合液有的准备：

200 μL 结合液 + 0.2 μL 酵母 tRNA + 9 μL 糖原

- ✚ 如果是提取酵母 DNA 和 E.coli DNA，工作结合液中不要加酵母 tRNA。

- ✚ 按照上述单个样品的工作结合液用量和样品数，计算和配制本次实验所需的工作结合液总体积。

二、样品准备

◆ 生物制品纯化过程中的上游中间样品（可能含有较高的 DNA 含量）

1) **先稀释后纯化：**用 1×PBS (pH 7.4, 无镁离子和钙离子) 进行适当比例稀释后再进行样品纯化处理。

2) **先纯化后稀释：**用稀释液对样品纯化后再进行稀释处理。

- ✚ 为了保证检测的准确性，使样品的检测值在标准曲线线性范围之内，高 DNA 含量样品需要进行适当比例稀释处理（一般可考虑将高 DNA 含量样品稀释 100 倍或 1000 倍）。

- ✚ 如果样品经过稀释，则用稀释液作为阴性对照。

◆ 干粉状态样品（选其一）

1) **样品溶解及纯化：**用稀释液将干粉样品进行溶解，再进行样品纯化处理。

2) **样品溶解稀释及纯化：**用适当的试剂将干粉样品溶解，配成高浓度溶液，再用稀释液稀释后，进行样品纯化处理。

- ✚ 一般可考虑将干粉样品稀释成 10 mg/mL 或 100 mg/mL。

◆ pH 过高或过低样品

1) **要求：**一般情况下生物制品纯化过程中间样品的 pH 值均为中性，若样品的 pH<5 或者 pH>9，则会影响样品纯化处理效果。

2) **调节 pH：**样品处理前先测试一下样品 pH 值，并可以用 1M 的 HCl 或 NaOH 调整样品的 pH 至中性后 (pH 6.0-8.0) 再进行纯化操作。

◆ 对照样品处理

➤ **样品平行处理：**为了确保结果的准确性，建议每个样品平行进行三次 DNA 提取处理和检测。

➤ 阴性对照 (NCS)

每次实验中都需要设置一个 NCS 作为空白样品，NCS 与其他待测样品一起进行处理，以检验在样品处理过程中是否存在交叉污染或环境污染。

➤ 加标回收 (ERC)


用 ERC 来评估 DNA 提取的效率、回收率和准确度，并可用 ERC 来评估验证分析方法和系统性能。对具体样品的 DNA 加标量设定在其无加标测试值的 2-10 倍为宜。

三、 样品消化

1. 取 100 μ L 待检测样品到 1.5 mL 干净的低吸附离心管中。

2. 在所有样品中，加入 10 μ L 5M NaCl，振荡混匀。

3. 加入蛋白酶 K 消化液振荡混匀，55°C 金属浴 1 小时。

 为了使样品消化更加完全，可在孵育至 30 分钟左右时再次进行涡旋振荡混匀后继续孵育。

 注意样品预处理好后需尽快进行下述的 DNA 提取实验！

四、DNA 提取

◆ 提取准备

按照下述 96 深孔板排布预先加入相应溶液：

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1											
S2						S1 ERC					
S3						S2 ERC					
S4						S3 ERC					
S5						S4 ERC					
S6						S5 ERC					
						S6 ERC					
NCS						PCS					
工作结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	工作结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/
样品						样品					

其中：

第 1 或 7 列：工作结合液 209.2 μL /孔，异丙醇 200 μL /孔以及消化后的全部样品

第 2 或 8 列：洗涤液 A 700 μL /孔


第 3 或 9 列：洗涤液 B 700 μL /孔

第 4 或 10 列：磁珠 15 μL /孔

第 5 或 11 列：洗脱液 100 μL /孔

 消化后的样品可在其他试剂全部加完后再加。样品体积最大为 500 μL /孔。

◆ 程序启动

1. 电源键打开—点击“登录”输入账号及密码—进入主页面。
2. 75%酒精棉球擦拭仪器内部—点击“紫外灯”—选择“15 分钟”。
 此步骤可在提取准备操作之前进行。
3. 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置，并把塑料套管插入磁头对应位置。
4. 点击“运行”—选择“rHCD-191”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行。
5. 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化液全部转移到新的离心管内。

注意要点:

1. 程序启动前, 一定要加套管。
2. 仪器工作前及完成后需要紫外灭菌至少 15 分钟, 两次提取间隔 30 分钟以上。
3. 程序运行完毕后, 需立即将样品洗脱液转移至干净的 EP 管内。
4. 请尽量在完成样品纯化处理当天进行后续的 DNA 检测, 以保证检测结果的准确性。

附表

常见问题	可能原因	解决方案
纯化回收率低	洗涤液 A 中未加入无水乙醇。	按照说明书预先在洗涤液 A 中加入无水乙醇并标记。
	仪器所在空间温度较低。	将室温调节在 20 °C 以上。
	磁珠贴壁。	将磁珠加入到深孔板底部中心。
	样品盐离子浓度较低。	用 5M 的 NaCl 调节盐离子浓度。
	样品 pH 值过低。	调整样品 pH 到中性范围。
	样品蛋白含量高。	可相应增加蛋白酶 K 用量和消化时间。
回收结果不稳定	磁珠保存于 -18 °C 及以下导致磁珠性能下降。	在 2-8°C 保存磁珠。
	加标不准确或洗脱液体积吸取不准确。	定期校准移液枪, 保证移液枪准确度; 使用低吸附和带滤芯枪头。
阴性污染	连续提取导致操作仓内有 DNA 污染。	75%乙醇喷洒操作仓, 擦拭干净后, 紫外灯照射 30 - 60 分钟。
	阴性与高浓度残留样品相互污染。	将阴性孔与高浓度残留样品隔开至少一个孔位。

修订日期: 2023 年 05 月 29 日
生效日期: 2023 年 06 月 01 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910