

宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法) 说明书

货号：SK030203D100

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：B/1

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）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。

本试剂盒可以手动操作，也可以通过 rHCDpurify®前处理系统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	NND031	1 mL×1 管	2-8℃
III	蛋白酶 K	NND023	500 μL×2 管	-18℃及以下
	糖原	NND035	500 μL×2 管	-18℃及以下
	酵母 tRNA	NND037	50 μL×1 管	-18℃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、无镁离子和钙离子 (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
- 磁性分离架和 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
- 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。
- 开启恒温金属浴, 设置温度为 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 (μL /样品)	蛋白酶 K 缓冲液 (μL /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

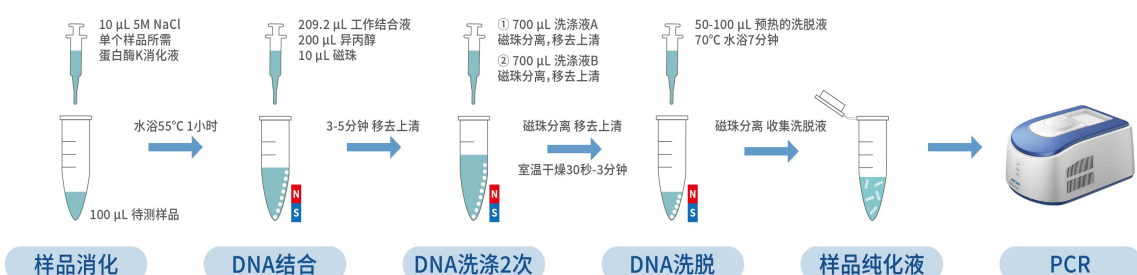
1. 取 100 μ L 待检测样品到 1.5 mL 干净的低吸附离心管中。
2. 在所有样品中, 加入 10 μ L 5M NaCl, 振荡混匀。
3. 加入蛋白酶 K 消化液振荡混匀, 55 °C 金属浴 1 小时。

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

(一) 操作过程 (手工操作)



◆ 结合

1. 磁珠使用前应在漩涡振荡器充分振荡 5 秒。
2. 从金属浴中取出样品, 快速离心 30 秒, 每管样品中加入 209.2 μL 工作结合液, 振荡混匀。
3. 快速离心 10 秒后在样品混合物中加入 200 μL 异丙醇, 10 μL 磁珠。
 如果样品较多, 每次加入磁珠过程中应再次充分振荡混匀磁珠, 以保证每次加入的磁珠量的一致性。
4. 将装有全部混合物的离心管置于漩涡振荡器上振荡 5 分钟, 快速离心 10 秒后静置于磁性分离架上。
 快速离心的目的在于将附着在离心管盖和壁上的混合物甩至管底。
5. 待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头小心移去上清。
 等待磁珠完全分离的时间约为 3-5 分钟。
 去除上清时枪头避免搅动磁珠, 避免磁珠同上清一起被去除。

◆ 洗涤

1. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 A, 振荡 10 秒使磁珠和洗涤液 A 混匀; 快速离心 10 秒后, 将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 1 次磁珠洗涤。
2. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 B, 振荡 40 秒使磁珠和洗涤液 B 混匀; 快速离心 10 秒后, 将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 2 次磁珠洗涤。
3. 为保证液体充分移除, 可将离心管再次快速离心 10 秒, 置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 用 10 μL 枪头小心的将残余液体吸除干净。
 去除上清时枪头避免搅动磁珠, 避免磁珠同上清一起被去除。
4. 从磁性分离架上取下离心管, 打开管盖在室温下干燥 30 秒-3 分钟, 除去残留的乙醇。
 干燥时间依具体情况而定, 室温较高或空气干燥的环境下可以选择较短干燥时间; 而室温较低或空气湿润环境下, 干燥时间可以稍长。

◆ 洗脱

1. 沿离心管壁加入 50-100 μL 70 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗脱液, 用漩涡振荡器轻微振荡 5 秒使磁珠和洗脱液混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 7 分钟, 水浴过程中可再次振荡混匀 2-3 次。

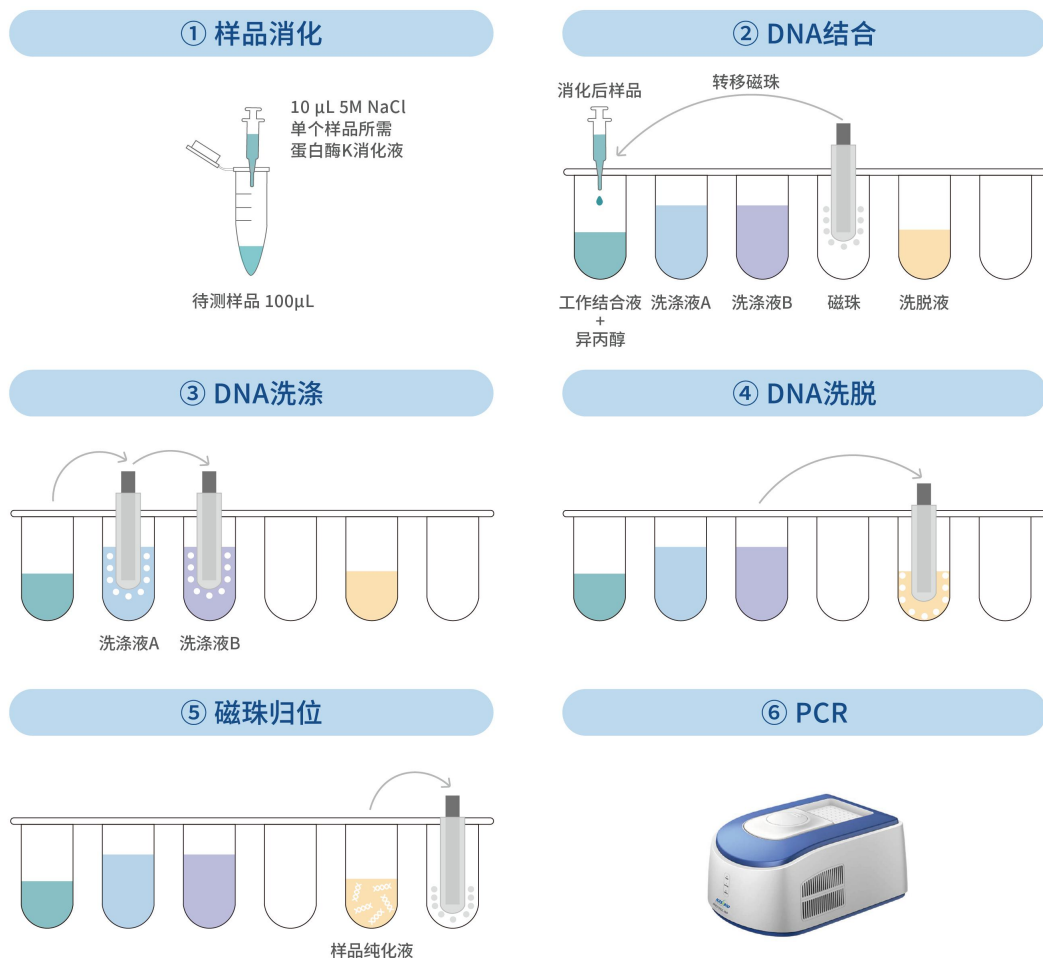
✚ 振荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。

✚ 振荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新震荡混匀。

2. 孵育完成后, 将离心管高速离心 1 分钟, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头小心转移溶液到干净的离心管中。
3. 将上一步获得的离心管快速离心 10 秒, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头再次转移溶液到干净离心管, 所得即为样品纯化液。

✚ 收集洗脱液时, 应将离心管内溶液转移完全, 离心管内不得残留液体, 否则将影响样品检测的准确性。

(二) 操作过程 (rHCDpurify® 前处理系统)



◆ 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-03D100”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. DNA 洗涤和洗脱操作时，每次振荡混匀后，都应该短时间快速离心，以保证没有磁珠或液体附着于离心管盖或管壁上。
2. 在每一步操作时，用左手顺时针方向环握 EP 管，大拇指轻轻地打开管盖，勿将液体溅出。
3. 在磁性分离架上分离磁珠时，中途可以适当旋转离心管，使磁珠吸附更加集中。
4. 在去除乙醇干燥时，观察磁珠状态，勿让磁珠太干，以免洗脱时不完全溶解。
5. 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
	洗涤后磁珠过干，影响 DNA 洗脱	磁珠干燥时间不要过长，室温较高或空气干燥的环境下 30 秒-1 分钟即可，室温较低或空气湿润环境下，干燥 1-3 分钟
	洗脱时磁珠附着于管壁，洗脱液与磁珠未能充分混匀	将已加入洗脱液的离心管置于漩涡震荡器上振荡，使磁珠从管壁上脱落且与洗脱液混匀；如操作后磁珠仍附着于管壁，可将离心管 70 °C 水浴 2 分钟后于漩涡震荡器上振荡，直至磁珠与洗脱液混匀
	磁珠吸附力下降	预先小量分装磁珠，37 °C 反复加热不要超过 5 次
	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
	洗涤过程中磁珠有损失	洗涤过程中如发现磁珠吸附位置太过靠近管底，可轻柔吹打几次，使管底磁珠往上吸附
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
	洗脱后纯化液中残留磁珠	对仍有磁珠残留，可重复离心一次，吸取上清

修订时间：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