

宿主细胞残留 DNA 复杂基质样本前处理 试剂盒（磁珠法） 说明书

货号：1104198

在实验前请完整阅读本说明书，特别是注意要点和常见问题！

版本：A/0

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 复杂基质样本前处理试剂盒（磁珠法）用于生物制品复杂基质和普通基质下样品的前处理，其中复杂基质包括过阴离子交换柱的蛋白类样品、蛋白浓度高且 pH 值非中性的样品等，可稳定高效地获得样品中的微量宿主细胞 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。

本试剂盒可以根据以下内容进行手动操作，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，参照 rHCDpurify® 的说明书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	
	洗脱液	NND018	10 mL × 1 瓶	
	稀释液	NND021	10 mL × 1 瓶	
	蛋白酶 K 缓冲液	NND026	10 mL × 3 瓶	
	样品纯化剂	NND091	3.6 g × 1 瓶	
II	磁珠	NND030	750 μL × 2 管	2-8 °C
III	蛋白酶 K	NND023	500 μL × 4 管	-18 °C 及以下
	助沉剂 II	NND004	500 μL × 2 管	
	助沉剂 I	NND003	25 μL × 2 管	

■ 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）
- 一次性手套
- PCR 8 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®前处理系统或磁性分离架
- 漩涡震荡器
- 恒温水浴锅或金属浴
- 1000 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪
- 荧光定量 PCR 仪
- 超净台

■ 实验流程



备注: 以上操作流程仅供参考, 具体可根据实际情况进行调整并验证。

■ 实验准备

1. 开启新试剂盒时需完成以下工作:

- (1) 在新开启的洗涤液 A 中加入 40 mL 的无水乙醇。
- (2) 干净的试剂瓶中用无水乙醇和超纯水配制 70%乙醇溶液 70 mL, 标记为洗涤液 B。

备注: 配制后的洗涤液应密封, 室温保存, 防止乙醇挥发。

- (3) 样品纯化缓冲液的制备 (如需): 取 1 瓶蛋白酶 K 缓冲液将其全部倒入装有样品纯化剂的瓶中, 拧紧盖子后上下颠倒混匀, 标记为样品纯化缓冲液。

2. 每次实验前需预先完成以下工作:

- (1) 准备好 100%的异丙醇。
- (2) 准备好 1-2 个温度, 65 °C或 100 °C。
- (3) 按照以下配比配制所需的工作结合液的准备:

单个样品所需的工作结合液 = 200 μL 结合液 + 0.4 μL 助沉剂 I + 10 μL 助沉剂 II

备注: 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。使用前若发现结合液出现结晶或沉淀, 应 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 待完全溶解后, 震荡混匀。

3. 样品准备

- (1) 样品稀释: 如果待检测样品是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。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, 一般可考虑将高 DNA 含量样品稀释 100 倍或 1000 倍。如果稀释了样品, 则用稀释液作为阴性对照。
- (2) 若样品为干粉状态, 可以用稀释液将干粉样品进行溶解, 再进行下一步操作; 或先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, 进行下一步操作。一般可考虑将干粉样品稀释成 10 -100 mg/mL 。
- (3) 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。
- (4) 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。
- (5) 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。

■ 样品消化

1. 根据样品类型配制对应的蛋白酶 K 消化液

- (1) 蛋白浓度高且 pH 值非中性的样品和普通基质样品

单个样品所需的蛋白酶 K 消化液 = 20 μL 蛋白酶 K + 200 μL 蛋白酶 K 缓冲液

- (2) 过阴离子交换柱类蛋白样品

单个样品所需的蛋白酶 K 消化液 = 20 μL 蛋白酶 K + 100 μL 蛋白酶 K 缓冲液 + 100 μL 样品纯化缓冲液

备注: ①按照上述单个样品的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。

②使用前若发现蛋白酶 K 缓冲液出现结晶或沉淀, 应 37 °C 水浴, 待完全溶解后, 震荡混匀。

③样品纯化缓冲液为固液混合状态, 使用前需要注意充分混匀。

2. 将蛋白酶 K 消化液平均分装到 1.5 mL 干净的离心管中, 之后在离心管中加入 100 μ L 待测样品或一定体积的加标回收 (ERC) 样品, 振荡混匀后, 快速离心。

3. 将以上混液置于 65 °C 水浴或金属浴中消化 15-30 分钟。

备注: 对于过阴离子交换柱类蛋白样品消化后, 需剧烈振荡混匀 2 分钟, 之后置于 100 °C 水浴或金属浴中处理 8 分钟。

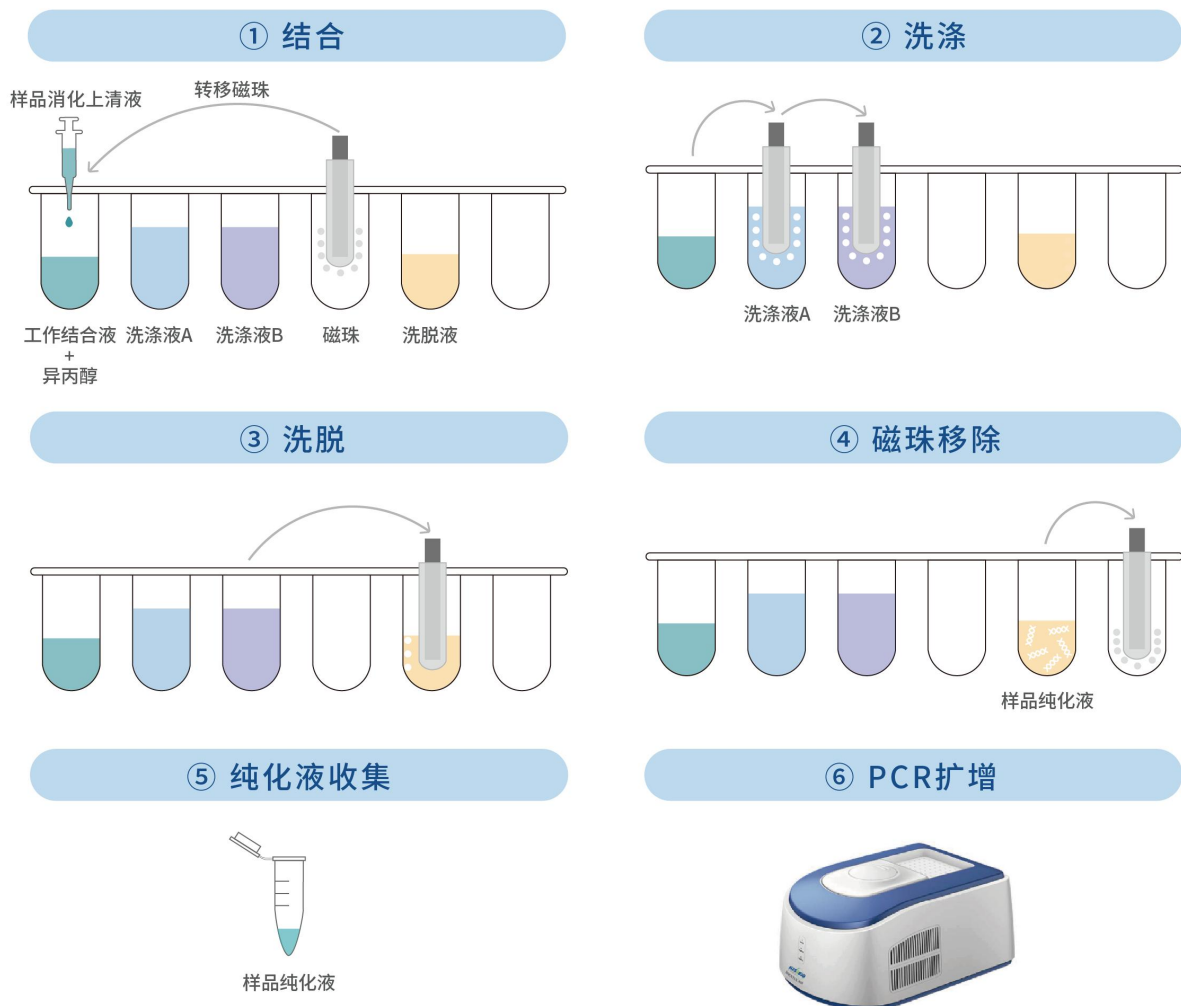
4. 样品冷却至室温后, 室温条件下 12000 rpm 离心 10 分钟, 尽量将全部上清转移至新的 1.5 mL 离心管中备用。

备注: ①普通基质类样品可根据实际情况选择不离心。

②以上样品消化流程仅供参考, 具体可根据实际情况进行调整并验证。

■ 核酸提取

● 机器提取 (rHCDpurify® 前处理系统)



1. 提取准备

按照表 2 预先加入相应溶液:

表 2. 96 深孔板排布

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1						S1 ERC					
S2						S2 ERC					
S3						S3 ERC					
S4						S4 ERC					
S5						S5 ERC					
S6						S6 ERC					
NCS											

其中:

第 1 或 7 列: 工作结合液 210.4 μL /孔, 异丙醇 500 μL /孔以及全部样品消化上清液

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 60-100 μL /孔

2. 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”

备注: 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。

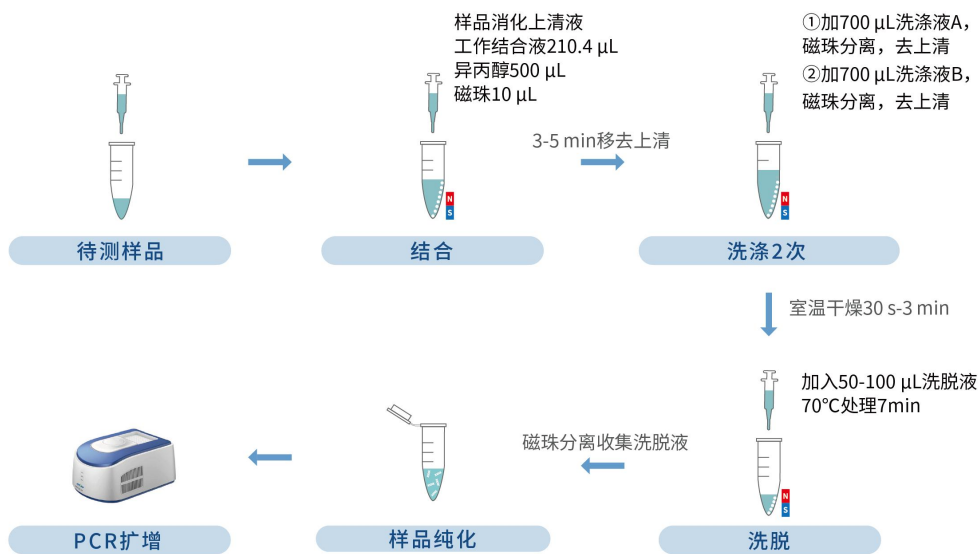
(4) 点击“运行”—选择对应程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行。

(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对应 EP 管内。

3. 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，需立即将样品纯化液转移至干净的 EP 管内。为保证检测结果的准确性请尽量在完成样本纯化处理当天进行后续的 DNA 检测。
- (4) 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 °C。

● 手工提取



1. 结合

- (1) 在上述样品上清液中加入 210.4 μL 工作结合液，振荡混匀。
- (2) 快速离心 10 秒后在样品混合物中加入 500 μL 异丙醇混匀后，加入 10 μL 磁珠。
备注：磁珠使用前应在漩涡振荡器充分振荡 5 秒。如果样品较多，每次加入磁珠过程中应再次充分震荡混匀磁珠，以保证每次加入的磁珠量的一致性。
- (3) 将装有全部混合物的离心管置于漩涡震荡器上振荡 5 分钟，快速离心 10 秒后静置于磁性分离架上。
- (4) 待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头小心移去上清。
备注：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。

2. 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。

备注: 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。

备注: 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缩短干燥时间; 而室温较低或空气湿润环境下, 干燥时间可以稍长。注意防止干燥过度, 避免影响磁珠性能。

3. 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。

备注: 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。

备注: 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。

生效时间: 2025 年 02 月 27 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: 400-878-2189