



残留 DNA 样品前处理试剂盒(100T)

本试剂盒适用于生物制品样本中残留 DNA 检测的前处理,经化学裂解和磁珠吸附可以从各种样品类型中最大限度提取极微量 DNA。

该试剂盒可以和多种类型的宿主细胞 DNA 残留 (qPCR 法) 检测试剂盒配合使用,包括 CHO 宿主细胞残留 DNA 检测试剂盒 CH-D050T / CH-D100T, HEK293 宿主细胞残留检测试剂盒 HK-D050T/ HK-D100T, NS0 宿主细胞残留 DNA 检测试剂盒 NS-D050T/ NS-D100T, Vero 宿主细胞残留 DNA 检测试剂盒 VE-D050T/ VE-D100T, E.Coli 宿主细胞残留 DNA 检测试剂盒 EC-D050T/ EC-D100T, 毕赤酵母宿主细胞残留 DNA 检测试剂盒 PP-D050T/ PP-D100T 配合使用。

一、产品组分与储存条件

收到货后,请按下表对盒内物品进行检查,若数量无误,按照相应的储存条件保存。

以下试剂足提取 100 次。

组分	数量	储存条件
裂解液	10mL/瓶*1	室温
结合液	40mL/瓶*1	
洗涤液 A	25mL/瓶*1 需加 25mL 无水乙醇	
洗涤液 B	15mL/瓶*1 需加 45mL 无水乙醇和 420μL 糖原	
洗脱液	10mL/瓶*1	
磁珠悬浮液	1mL/管*2	4°C冰箱
蛋白酶 K ^[1]	1mL/管*2	-20°C
糖原 ^[2]	1.3mL/管*1	

备注: [1][2]我们建议第一次化冻该组分时进行分装,避免反复冻融对其效果产生影响。

二、自备材料

- 自备设备: 磁性分离架, 涡旋振荡器, 适配 2mL 离心管的迷你离心机或普通离心机, 水浴锅。
- 自备耗材: 低吸附带滤芯的无酶无菌枪头 10μL-1000μL 及相应的移液枪, 1.5mL 或 2mL 的无菌无酶低吸附的离心管。
- 自备试剂: 无水乙醇(分析纯), 1×PBS 缓冲液 (pH 7.4, 无 Mg²⁺和 Ca²⁺)、无酶水。

三、实验前注意事项

- 操作前请仔细阅读本说明书, 并严格按照说明书操作。
- 为了您的安全, 操作时请穿好实验服戴好一次性手套。
- 本实验建议在生物安全柜或超净台中进行。



4. 为避免交叉污染，请勤换枪头，枪头不要重复使用。
5. 每次实验前请检查常温保存的各溶液是否有析出，尤其在冬季室温较低时，若瓶中有析出，可以在 37°C 水浴锅中晃动使其溶解。
6. 洗涤液 A 和洗涤液 B 在加完无水乙醇后，请在瓶身做好标记，每次实验结束后请拧紧瓶盖，并封上封口膜，以免乙醇挥发。

四、DNA 提取方法

1. 第一次使用前，请先向洗涤液 A 加入 25mL 无水乙醇混匀，向洗涤液 B 加入 45mL 无水乙醇和 420 μ L 糖原混匀，并分别在瓶身做好标记。
2. 实验开始前，将水浴锅设定为 56°C(如果只有一个水浴锅，先将温度设定为 56°C。如果有两个水浴锅，一个温度设定为 56°C，一个设定为 65°C，并将洗脱液放进 65°C 水浴锅中预热)。
3. 样品预处理
 - 3.1. 纯化早期的样本，或 DNA 含量比较高的样品，建议对样品进行适当比例稀释后提取。
 - 3.2. 若样品为干粉，建议用无酶水或者 1 \times PBS 缓冲液 (pH 7.4, 无 Mg²⁺和 Ca²⁺) 稀释成 10mg/mL 进行提取。
 - 3.3. 如果样品溶液背景复杂，建议进行加标回收实验，以确定合适的样品稀释倍数。
4. 取 100 μ L 样品加入 1.5mL 或 2mL 无酶无菌离心管中，建议每个样品一式三份。加入 10 μ L 蛋白酶 K 混匀。

注：如果样品浓度在 0-100mg/mL，蛋白酶 K 建议用 10 μ L。如果样品浓度在 100-200mg/mL，蛋白酶 K 建议用 20 μ L。
5. 56°C 孵育 30min。

注：如果只有一个水浴锅，此步结束后将水浴锅温度设定为 65°C，并将洗脱液放进水浴锅预热。
6. 孵育结束，稍微恢复室温后，每管加入 100 μ L 裂解液，8 μ L 糖原，涡旋混匀。
7. 使用磁珠前，务必震荡彻底确保磁珠全部悬浮起来，每管加 20 μ L 磁珠，涡旋混匀。

注：添加磁珠时，请确保磁珠全部悬起，建议每加 4 次磁珠就涡旋混匀一次再继续添加。
8. 在第一个管子中加入 400 μ L 结合液，并立即混匀，其余各管均重复此操作。

注：添加了结合液后务必立即涡旋混匀，否则可能导致产率降低。
9. 静置 10min，并每隔 3min 涡旋 10s。
10. 迷你离心机或普通离心机 4000rpm 离心 5s，放在磁力架上静置 1-2min 直到溶液完全澄清，小心地用移液枪吸弃上清。
11. 每管加入 500 μ L 洗涤液 A 后，涡旋混匀并确保磁珠全部悬浮，离心 5s，放在磁力架上静置 1-2min，直到溶液澄清，小心用移液枪吸弃上清。

注：第一次使用时请确保洗涤液 A 中加入 25mL 无水乙醇。



12. 每管加入 500 μ L 清洗液 B，涡旋混匀并确保磁珠全部悬浮，离心 5s，放在磁力架上静置 1-2min，直到溶液澄清，小心用移液枪吸弃上清，并确保管中无任何液体残留。
注：第一次使用时请确保洗涤液 B 中加入 45mL 无水乙醇和 420 μ L 糖原。
13. 打开盖子，室温放置 3-5min，期间观察磁珠表面，待磁珠表面失去反光后，立即加入预热的洗脱液 100 μ L，并涡旋混匀，使磁珠全部悬浮。
注：此步务必仔细观察磁珠，确保乙醇完全挥发且磁珠不会过度干燥，残留的乙醇会干扰后续的 qPCR 实验，过度干燥则会导致 DNA 回收率降低。
14. 65 $^{\circ}$ C 孵育 6min，每 2min 取出涡旋混匀一次，帮助磁珠全部悬浮。
注：65 $^{\circ}$ C 孵育时，建议在离心管上压上重物或缠上封口膜，因为离心管受热后很容易将盖子崩开。
15. 孵育结束稍微恢复下室温，离心机上离心 5-10s 后放在磁力架上静置 1-2min。用移液枪将洗脱液转移到一个新的无酶无菌低吸附的离心管中。
16. 样品可以立即进行后续 qPCR 程序，或 4 $^{\circ}$ C 保存 6h，-20 $^{\circ}$ C 保存 24h。