

Magnetic Residual DNA Preparation Kit

磁珠法宿主残留 DNA
提取试剂盒
(栎海生物)
使用说明书

一、产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，可用于各类生物制品样本的前处理，分离纯化高质量宿主细胞残留 DNA。本试剂盒适用于多种基质缓冲溶液，有效提取纯化微量 DNA。独特包埋的磁珠，在一定条件下对核酸具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的核酸，能够达到快速分离纯化核酸的目的。提取的宿主细胞残留 DNA 纯度高、质量稳定可靠。本试剂盒可与自动核酸提取仪搭配使用，实现自动化提取。使用本试剂盒纯化的宿主残留 DNA 可与栎海生物宿主 (CHO、Vero、Yeast、E.coli、Human 等) 残留 DNA 检测试剂盒配合使用。

二、储存条件

该试剂盒所有组分置于室温 (15-30° C) 干燥条件下，可保存 12 个月。若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在 37° C 水浴中预热 10min，以溶解沉淀。

三、产品内容

产品组成	YH-M100T (100ulX100perps)
组织消化液 MGHA(BufferMGHA)	20ml
裂解液 MGHH-A(BufferMGHH-A)	20ml
缓冲液 MGDF(BufferMGDF)	105ml
漂洗液 MPWG(BufferMPWG)	40ml
洗脱缓冲液 MTBC(BufferMTBC)	15ml
ProteinaseK	2×1ml
核酸保护剂 ST(BufferST)	3×1ml
磁珠悬浮液 MGHE(MagAttractSuspensionMGHE)	1.5ml
CarrierRNA (310 μg)	1 支
RNase-FreeddH2O	2×1ml

四、产品特点

1. 操作灵活: 磁珠法, 可配合手工或全自动核酸提取纯化仪。
2. 通用性强: 可满足高低 pH、高盐、高蛋白等复杂样品的核酸提取。
3. 准确灵敏: 回收率在 70%-130%; 可以纯化富集低至 fg 级别的 DNA。
4. 快速高效: 操作步骤简单, 1h 即可完成整个流程。

注意事项, 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 使用前请仔细阅读使用说明, 严格按照使用说明书操作。
2. 本试剂盒提取样本核酸含量为微量, 操作过程要特别注意防止核酸降解, 并避免交叉污染或环境污染。所使用的器皿、加样器等均应为专用, 离心管、枪头等一次性耗材需进行高压灭菌。操作人员应佩戴无粉手套、口罩等操作。
3. 洗脱时可能存在磁珠残留, 吸取洗脱产物时尽量避免吸入磁珠。
4. 提取产物应避免反复冻融, 否则会导致部分核酸损失。提取产物可立即进行后续定量 PCR 检测, 也可于 2-8°C 保存待测, 保存时间不超过 24 小时。长期保存可置于 -30~-15°C 或 -90~-65°C 冷冻保存。
5. 妥善处置所用样本及试剂材料, 彻底清洗并消毒所用操作台面。

五、实验数据

1. 评价栎海试剂盒对不同浓度 CHO DNA 的回收效率

方法：

1. 取冻干的 CHO DNA 对照品，加水 680ul 溶解；
2. 用水配制 30-0.003ng/ml 五个浓度的标准品，5ul/样品，绘制标准曲线；
3. 取 5 个浓度的标准品各 100ul（每个浓度重复 3 次），用栎海的磁珠法 DNA 残留试剂盒进行提取回收；
4. 使用冻干 PCR 试剂测定不同浓度样品的回收率；

结果：

理论添加浓度		原始 CT	计算浓度	平均值	加标回收浓度	回收率
0.003ng/mL	重复 1	31.92847	0.001596	0.00179	0.002119	81.20%
		31.5023	0.002139			
		31.89194	0.001636			
	重复 2	31.35034	0.002374	0.0023		
		31.34262	0.002386			
		31.50232	0.002138			
	重复 3	31.42258	0.002259	0.002268		
		31.32034	0.002423			
		31.51298	0.002123			
0.03ng/mL	重复 1	24.70864	0.227467	0.019757	0.020381	78.10%
		24.68674	0.230916			
		24.72104	0.225539			
	重复 2	24.81721	0.21112	0.022457		
		24.92715	0.195763			
		24.95541	0.192			
	重复 3	24.71103	0.227095	0.018929		
		24.83315	0.20882			
		24.76902	0.218225			

0.3ng/mL	重复 1	24.70864	0.227467	0.227974	0.215216	82.50%
		24.68674	0.230916			
		24.72104	0.225539			
	重复 2	24.81721	0.21112	0.199627		
		24.92715	0.195763			
		24.95541	0.192			
	重复 3	24.71103	0.227095	0.218047		
		24.83315	0.20882			
		24.76902	0.218225			
3ng/mL	重复 1	24.70864	0.227467	2.106934	2.272178	87.10%
		24.68674	0.230916			
		24.72104	0.225539			
	重复 2	24.81721	0.21112	2.409268		
		24.92715	0.195763			
		24.95541	0.192			
	重复 3	24.71103	0.227095	2.300331		
		24.83315	0.20882			
		24.76902	0.218225			
30ng/mL	重复 1	24.70864	0.227467	23.22915	23.01338	88.20%
		24.68674	0.230916			
		24.72104	0.225539			
	重复 2	24.81721	0.21112	23.48658		
		24.92715	0.195763			
		24.95541	0.192			
	重复 3	24.71103	0.227095	22.3244		
		24.83315	0.20882			
		24.76902	0.218225			

2. 自动化仪器提取步骤

- 1) 在深孔板第 1、7 列中分别加入步骤 2 处理后的全部溶液。
- 2) 将深孔板放置于自动核酸提取仪底座上，将磁棒套插入卡槽内并确保卡扣到位。
- 3) 运行提取程序：打开仪器配套软件，双击图标进入控制程序，点击“运行”，选择相应程序文件并点击“运行”按钮开始实验。

自动核酸提取程序如下表所示：

裂解加热:OFF

裂解温度:--

裂解加热终止步骤:1

洗脱加热:ON

洗脱温度:90

洗脱加热开始步骤:7

步骤	槽位	名称	等待时间 (min)	混合时间 (min)	磁吸时间 (min)	混合速度	体积 (μ l)	温度 ($^{\circ}$ C)	强力吸附
1	4	吸磁珠	0	0	1	快	700	--	循环
2	1	结合	0	10	1	快	900	--	循环
3	2	漂洗 1	0	2	1	快	700	--	循环
4	3	漂洗 2	0	2	1	快	700	--	循环
5	4	漂洗 3	0	2	1	快	700	--	循环
6	6	漂洗 4	0	2	1	快	700	--	循环
7	5	洗脱	0	7	2	快	100	90	循环
8	6	弃磁珠	0	1	0	快	700	--	普通

注意:自动化提取仪在洗脱时温度比手工提取高,是因为提取所用深孔板厚度一定程度上影响导热性,导致

实际洗脱液温度会低于设定温度 10-20 $^{\circ}$ C,使用时可根据搭配的深孔板和自动提取仪的实际情况,适当提高洗脱

设定温度。

4) 自动化程序结束后，将深孔板第 5、11 列中的核酸溶液吸出，转移至新的离心管中，并于适当条件保存。

六、手工提取步骤

使用前先在缓冲液 MGDF、漂洗液 MPWG 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 试剂准备

1) CarrierRNA 溶解方法:

将含有 310 μ g CarrierRNA 干粉管瞬时离心，加入 310 μ l RNase-Freedom H₂O，涡旋混匀。

注意:溶解后的 CarrierRNA 需在 -30~-15 $^{\circ}$ C 条件下保存，并在冻存前将其按照每次实验的使用量分装，

避免反复冻融，

2) CarrierRNA 预混液配置方法(现用现配)

按照每次提取用 3 μ l CarrierRNA 溶液和 7 μ l RNase-Freedom H₂O 的比例配置预混液。例如，配置 17 份预混液，取 51 μ l CarrierRNA 溶液和 119 μ l RNase-Freedom H₂O，吸打混合，每次提取使用 10 μ l 预混液。

注意:CarrierRNA 预混液必须现用现配，否则影响使用效果。

3) 实验所需自备试剂:

无水乙醇、异丙醇、样本稀释液 1 \times PBS(pH7.4, 无 Ca²⁺和 Mg²⁺)

2. 样本准备

1) 样本稀释:

如果待检测样本是生物制品纯化过程中的上游中间样本，可能含有较高的 DNA 含量。为了保证检测的准确性，使样本的检测值在标准曲线线性范围之内，可以用样本稀释液 1 \times PBS(pH7.4, 无 Ca²⁺和 Mg²⁺)对高 DNA 含量样本进行适当比例的稀释后再进行样本纯化处理;也可以在样本纯化处理完成之后，用核酸稀释液对纯化处理后的样本进行稀释，然后再进行 DNA 残留检测。一般可考虑将高 DNA 含量样本稀释 100 倍或 1000 倍。如果稀释了样本，则用样本稀释液作为阴性对照。

2) 若样本为干粉状态，可以用样本稀释液将干粉样本进行溶解，再进行下一步操作;或先用适当的试剂将干粉样本溶解，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本稀释成 10mg/ml 或 100mg/ml。

3) 样本平行处理:

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 作为空白样本, NCS 与其他待测样本一起进行处理, 以检验在样本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。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。

3. 样本消化

取 100 μ l 样本, 加入 100 μ l 1 \times PBS、150 μ l Buffer MGHA、150 μ l Buffer MGHH-A、30 μ l 核酸保护剂 ST 和 20 μ l Proteinase K, 涡旋振荡混匀, 65 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 之后冷却至室温, 并瞬时离心。

注意:

1. 试剂使用前, 请先确认溶液 MGHA 与溶液 MGHH-A 没有沉淀析出, 如溶液中有沉淀, 可 37 $^{\circ}$ C 水浴加热 10min, 确认沉淀溶解后再使用。
2. 可将核酸保护剂 ST 与 Proteinase K 按用量比例配置预混后再加入, 提高小体积加样的准确性。

4. 核酸结合

1) 加入 350 μ l 异丙醇、15 μ l 磁珠悬浮液 MGHE 和 10 μ l Carrier RNA 预混液, 涡旋振荡孵育结合 10min。

注意: 磁珠 MGHE 使用前需涡旋混匀 1min, 使磁珠完全分散混匀没有结块后再使用。

2) 将离心管置于磁力架上 2min, 待磁珠完全吸附时用移液器小心吸弃液体。

5. 核酸漂洗

1) 加入 700 μ l 缓冲液 MGDF (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 涡旋混匀 2min 使磁珠充分悬浮。

2) 将离心管置于磁力架上 1min, 待磁珠完全吸附时用移液器小心吸弃液体。

3) 加入 700 μ l 缓冲液 MGDF, 涡旋混匀 2min 使磁珠充分悬浮。

4) 将离心管置于磁力架上 1min, 待磁珠完全吸附时用移液器小心吸弃液体。

5) 加入 700 μ l 漂洗液 MPWG (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 涡旋混匀 2min 使磁珠充分悬浮。

- 6) 将离心管置于磁力架上 1min，待磁珠完全吸附时用移液器小心吸弃液体。
- 7) 加入 700 μ l 漂洗液 MPWG，涡旋混匀 2min 使磁珠充分悬浮，瞬时离心以去除管盖内壁的液滴。
- 8) 将离心管置于磁力架上 1min，待磁珠完全吸附时用移液器小心吸弃液体。9) 将离心管保持在磁力架上，室温晾干 5-10min.

注意:

乙醇残留会抑制后续的酶反应，晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱核酸。

6. 核酸洗脱

- 1) 加入 100 μ l 洗脱缓冲液 MTBC，涡旋振荡混匀使磁珠重新悬浮，70 $^{\circ}$ C 孵育 7min，期间每 2min 涡旋振荡混匀使核酸充分洗脱。
- 2) 将离心管放置于磁力架上静置 2min，待磁珠完全吸附时小心将核酸溶液转移至新的离心管中，并于适当条件*保存。

注意:可适当延长本次磁吸时间，或可在磁吸结束后高速离心 2min 转移核酸溶液至新的离心管中，确保溶液中没有磁珠残留，以避免对后续实验造成影响。

*注意:如当天进行后续定量 PCR 检测，核酸产物可在定量检测前暂存于 2-8 $^{\circ}$ C。如隔天再进行后续检测实验，建议保存于-30~-15 $^{\circ}$ C。从低温取出样本进行定量 PCR 检测前，需将样本短时涡旋混匀。

七、自动化提取步骤

1. 试剂准备与样本准备:同手工提取步骤 1、2。
2. 样本消化及试剂分装
 - 1) 取 100 μ l 样本，加入 100 μ l 1 \times PBS、150 μ l BufferMGHA、150 μ l BufferMGHH-A、30 μ l 核酸保护剂 ST 和 20 μ l ProteinaseK，涡旋振荡混匀，65 $^{\circ}$ C 孵育 10min；

注意:可将核酸保护剂 ST 与 ProteinaseK 按用量比例配置预混后再加入，提高小体积加样的准确性。
 - 2) 冷却至室温，瞬时离心，即可转移处理好的样本至深孔板中，上机提取(上样前先按照步骤 3 分装试剂)；
 - 3) 自动提取试剂按照以下表格进行分装：

第 1/7 列	第 2/8 列	第 3/9 列	第 4/10 列	第 5/11 列	第 6/12 列
异丙醇			MPWG700μl		
350μlCarrierRNA	MGDF700μl	MGDF700μl	磁珠	MTBC100μl	MPWG700μl
预混液 10μl			MGHE15μl		

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。