

ExCell Bio

resiQuant 通用型宿主 DNA 残留样本前 处理试剂盒（磁珠法）说明书

本品仅用于科学研究及生产，不适用于临床诊断和治疗

User Manual

Catalog Number CRB00-0011
 CRB00-0012
 CRB00-0011S



I 产品概述

通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒（磁珠法）从通过细胞系（如CHO, *E.coli*, Human, Vero, Pichia, NS0和MDCK）生产的生物药原液、成品、半成品、中间品或工艺过程监控样本中提取宿主细胞DNA。该试剂盒用化学裂解和磁珠抽提不同类型样本的基因组DNA，包含高蛋白低DNA浓度的样本，可有效提取纯化微量DNA。

为定量宿主残留DNA，推荐将本试剂盒与本公司的DNA残留检测试剂盒（荧光探针qPCR法）配合使用。

I 产品应用

通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒（磁珠法）可提取生物制药生产工艺从中间产物到成品的微量残留宿主细胞基因组DNA，适用于各种常用的宿主细胞类型。

I 产品组分及储存条件

序号	组分	CRB00-0011 (50T)	CRB00-0012 (100T)	CRB00-0011S (25T)
Box 1	Lysis/Binding Buffer	5.2 mL	10.4 mL	2.6 mL
	Wash Buffer	70 mL	140 mL	35 mL
	Elution Buffer	5 mL	10 mL	2.5 mL
	Proteinase K Buffer	250 µL	500 µL	125 µL
	Magnetic Bead Solution	250 µL	500 µL	125 µL
Box 2	Proteinase K	500 µL	1 mL	250 µL
	Yeast tRNA	10 µL	20 µL	5 µL
	Glycogen	450 µL	900 µL	225 µL

保存条件：Box 1 放置室温保存，Box 2 于 -40 ~ -18℃保存。

有效期：规定保存条件下可保存 12 个月。

运输条件：Box 1 常温运输，Box 2 干冰运输。

| 实验准备

仪器及自备试剂

- 漩涡振荡器；
- 磁力架；
- 迷你离心机；
- 水浴锅或金属浴；
- 1.5 mL低吸附离心管；
- 无水乙醇（分析纯）；
- 1×PBS（pH 7.4，无Mg²⁺和Ca²⁺，除菌过滤）；
- 5M NaCl（优级纯，除菌过滤）；
- 超纯水（PCR级）。

试剂盒首次使用

- Lysis/Binding Buffer为浓缩液。若溶液发生沉淀，放置于37°C水浴中预热30分钟，以溶解沉淀；
- 按标签所示，加入无水乙醇至Lysis/Binding Buffer中，轻轻颠倒混匀；
- 每次提取前新鲜配制80%乙醇；
- 每次提取前每个样本新鲜配制裂解/结合液：

125 μ L Lysis/Binding Buffer + 9 μ L Glycogen + 0.2 μ L Yeast tRNA(提取酵母的残留 DNA 时不添加)，涡旋混匀，短暂离心，将溶液收集至管底。

| 实验流程

样本准备

样本稀释（如果需要）：制药工艺早期的样本通常含有超过标准曲线线性检测范围的 DNA 含量，在使用本试剂盒抽提之前，需要进行产品适用性研究，将样本用 1×PBS 进行适当稀释。样本稀释后，以空白基质稀释液作为阴性样本。

注意：用水和 TE 稀释样本会降低抽提效率

- 平行处理：每个样本建议进行三次 DNA 提取处理；
- 阴性样本（NEG）：每次实验中需要设置一个阴性样本 NEG，与其余样本一起处理，以检验样本处理过程中是否存在污染；
- 加标回收样本（ERC）：将宿主细胞 DNA 残留 qPCR 检测试剂盒中的标准品稀释到一定浓度，具体样品的 DNA 加标量设计参考产品适用性研究结果。

蛋白酶 K 处理

- 将 100 μ L 的样本，阴性样本和加标回收样本加入 1.5 mL 的离心管中；
- 每管加入 10 μ L Proteinase K（适用于蛋白含量 100 mg/mL 以下样本，高于该浓度按比例添加，最高不超过 50 μ L），5 μ L Proteinase K Buffer 和 10 μ L 5M NaCl，颠倒或涡旋充分混匀；
- 55°C 孵育 1 小时，室温放置 5 分钟，短暂离心后进行第二步的裂解/结合。

裂解/结合

1. 新鲜配制裂解/结合液（以下为一个样本所需用量）：

125 μ L Lysis/Binding Buffer + 9 μ L Glycogen + 0.2 μ L Yeast tRNA（提取酵母残留 DNA 时不需要添加 Yeast tRNA），涡旋混匀，短暂离心，加入一个样本管；
2. 将磁珠悬液 Magnetic Bead Solution 涡旋震荡 30 秒或颠倒混匀 10 次，每个样本中加入 5 μ L 后，室温涡旋震荡混匀或用力摇动离心管 10 分钟；

注意：加入样本之前充分混匀磁珠悬液，以确保无磁珠沉淀，以免造成 DNA 得率不一致。

3. 短暂离心收集悬液至管底，然后将离心管置于磁力架上，室温静置至溶液清澈（一般 2-5 分钟）；
4. 保持离心管于磁力架上，避免震动，用 1 mL 移液器小心吸去大部分溶液，注意不要触碰磁珠；
5. 继续保持离心管于磁力架上 1 分钟，用 200 μ L 移液器吸去残余上清。

洗涤液洗涤两次

1. 加入 700 μ L Wash Buffer 至上述样本管中，涡旋震荡 30 秒或颠倒混匀 10 次重悬磁珠；
2. 短暂离心，将离心管盖上吸附的液体收集到底部后，将离心管静置磁力架上 2 分钟，使磁珠成团贴壁，液体变清澈；

3. 用 1 mL 移液器尽量移除溶液;
4. 继续保持离心管于磁力架上 1 分钟, 再用 200 μ L 移液器移除剩余液体;
5. 从磁力架上取下离心管, 再次加入 700 μ L 的 Wash Buffer, 漩涡震荡 30 秒或颠倒混匀 10 次重悬磁珠;
6. 短暂离心, 将离心管盖上吸附的液体收集到底部后, 将离心管置于磁力架上 2 分钟, 使磁珠成团贴壁, 液体变清澈;
7. 用 1 mL 移液器尽量移除溶液;
8. 继续保持离心管于磁力架上 1 分钟, 再用 200 μ L 移液器移除剩余液体。

80%乙醇洗涤两次

1. 转移离心管至离心管架上并加入 700 μ L 80%乙醇。漩涡震荡 30 秒或颠倒混匀 10 次重悬磁珠;
2. 短暂离心, 将离心管盖上吸附的液体收集到底部后, 将离心管置于磁力架上 2 分钟, 使磁珠成团贴壁, 液体变清澈;
3. 用 1 mL 移液器尽量移除溶液;
4. 继续保持离心管于磁力架上 1 分钟, 用 200 μ L 移液器吸移除剩余洗液;
5. 重复上面第 1-4 步, 用 80%乙醇重复洗一次;
6. 将离心管保持在磁力架上, 继续干燥 5-10 分钟 (肉眼随时注意观察, 磁珠不要干裂, 以磁珠表面微微呈湿润状为宜)。

注意: 避免磁珠过分干燥, 导致磁珠粘在管壁上降低回收率。

洗脱

1. 将离心管转移至离心管架上并加入 100 μ L Elution Buffer;
2. 涡旋混匀后置于 70°C 孵育 15 分钟, 每 3 分钟涡旋混匀一次;
3. 孵育完成后短暂离心, 将离心管盖上吸附的液体收集到底部后, 将离心管置于磁力架上 2 分钟, 待样本温度恢复到室温水平, 磁珠成团贴壁, 液体变清澈。将溶液移至新 1.5 mL 离心管中, 记录转移体积, 随即进行样本检测。

检验结果说明

使用相应的 DNA 残留检测试剂盒（荧光探针 qPCR 法），在 qPCR 结果正常的情况下，计算回收率，应当在 70%~130% 之间。

操作注意细节

- 在磁力架上分离磁珠时，中途可适当左右旋转离心管，使磁珠吸附更加集中；
- 在磁珠洗涤或洗脱过程中，每次震荡混匀后都要用迷你离心机短暂离心，以保证没有磁珠液附着在离心管管盖和管壁上；
- 尽量在完成样品前处理纯化后就立即进行后续 DNA 检测，以保证检测结果的准确性。

| 免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。