

ExCell Bio

ResiQuant[®] 通用型宿主 DNA 残留样本前处理试剂盒（磁珠法）机提版说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRB00-0021S

CRB00-0021

CRB00-0022



| 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残留DNA，对高蛋白浓度样本，也可有效提取纯化微量DNA。

为定量检测宿主残留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。

| 产品应用

通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒（磁珠法）机提版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。

| 产品组分及储存条件

序号	组分	CRB00-0021 (50T)	CRB00-0022 (100T)	CRB00-0021S (25T)
Box 1	Lysis/Binding Buffer	10 mL	10 mL × 2	5 mL
	Wash Buffer	28 mL	28 mL × 2	14 mL
	Elution Buffer	5 mL	10 mL	2.5 mL
	Proteinase K Buffer	5 mL	5 mL × 2	2.5 mL
	Magnetic Bead Solution	500 µL	500 µL × 2	250 µL
Box 2	Proteinase K	1 mL	1 mL × 2	500 µL
	Yeast tRNA	10 µL	10 µL × 2	5 µL
	Glycogen	450 µL	450 µL × 2	225 µL

储存条件：Box 1 于常温保存，Box 2 于-40 ~ -18℃保存。

有效期：规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件：Box 1 常温运输，Box 2 干冰运输。

| 实验准备

1. 涡旋振荡器；
2. 磁力架；
3. 迷你离心机；
4. 水浴锅或金属浴；
5. 1.5 mL低吸附离心管；
6. 无水乙醇（分析纯）；
7. 异丙醇（分析纯）；
8. 1× PBS（pH 7.4，除菌过滤）；
9. 5 M NaCl（优级纯，除菌过滤）；
10. 超纯水（PCR级）。

试剂盒首次使用

1. Lysis/Binding Buffer、Proteinase K Buffer为浓缩液。若溶液出现沉淀，放置于37℃水浴中预热10分钟，以溶解沉淀；
2. Wash Buffer为洗涤液，首次使用前，请根据标签所示信息加入相应量无水乙醇；
3. 每次提取前新鲜配制70%乙醇；
4. 提取前单个样本新鲜配制裂解/结合液如下：

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

| 实验流程

样本准备

1. 样本稀释（如果需要）：上游工艺样本通常含有高水平的残留DNA，建议开展适用性研究以获得准确检测的最佳条件，样本可使用1× PBS缓冲液进行稀释；
2. 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；
3. 加标回收样本（ERC）：ERC用于评估检测效率，可通过向测试样本中添加适量标准DNA来制备。特定样本的DNA添加量可根据先前研究进行设计。

蛋白消化

1. 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；
2. 每管加入20 μ L Proteinase K, 100 μ L Proteinase K Buffer和20 μ L 5 M NaCl, 颠倒或涡旋充分混匀；
【注意事项】：若处理样本量大，可将 Proteinase K Buffer 与 5 M NaCl 按比例预混混匀，70℃ 孵育1min，使沉淀溶解。
3. 70℃ 孵育15 min, 室温放置5分钟，短暂离心；
4. 将管中液体全部转移至深孔板第一列对应孔中。

试剂分装（以第 1、5、7、11 列加热的直列式提取仪为例）

1. 第1和7列：200 μ L Lysis/Binding Buffer + 9 μ L Glycogen + 0.2 μ L Yeast tRNA (提取酵母残留DNA时不建议添加Yeast tRNA) + 200 μ L 100%异丙醇/孔；
2. 第2和8列：700 μ L Wash Buffer/孔；
3. 第3和9列：700 μ L 70%乙醇/孔；
4. 第4和10列：10 μ L Magnetic Bead Solution +200 μ L超纯水/孔；
5. 第5和11列：100 μ L Elution Buffer/孔；
6. 第6和12列：200 μ L超纯水/孔。

自动化程序

1. 按以下程序进行自动化提取实验：

步骤	槽位	名称	等待时间 (min: ss)	混合时间 (min: ss)	磁吸时间 (min: ss)	混合速度	体积 (μ L)
1	4	吸磁珠	00:00	00:10	00:50 \times 3	快速	200
2	1	结 合	00:00	10:00	00:50 \times 3	快速	545
3	2	洗涤 1	00:00	01:00	00:50 \times 3	中速	700
4	3	洗涤 2	00:00	01:00	00:50 \times 3	中速	700
5	5	洗 脱	04:00	00:30	00:50 \times 3	Bottom Mix	100
				09:00		底部暂停	
				00:30		Bottom Mix	
6	6	弃磁珠	00:00	00:10	00:00	快速	200

2. 洗脱温度设置：70℃，洗脱（第5步）开始加温步骤；
3. 自动化程序结束后，将第5及第11列的洗脱液转移至干净的无核酸酶离心管中，待用。

试剂分装（适用于轮盘式提取仪）

1. 第一块板（Sample）：200 μ L Lysis/Binding Buffer + 9 μ L Glycogen + 0.2 μ L Yeast tRNA (提取酵母残留DNA时不建议添加Yeast tRNA) + 200 μ L 100%异丙醇/孔，Magnetic Bead Solution 10 μ L/孔以及消化后

的全部样本；

2. 第二块板（Wash1）：Wash Buffer 700 μ L/孔；
3. 第三块板（Wash2）：70%乙醇700 μ L/孔；
4. 第四块板（Elution）：Elution Buffer 100 μ L/孔。

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

1. 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；
2. 在磁珠洗涤或洗脱过程中，每次振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；
3. 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。

常见问题及解答

常见问题	可能原因	解决方案
样本纯化回收率低	磁珠贴壁	将磁珠加入到深孔板底部中心
	Wash Buffer中未加无水乙醇	按照标签在Wash Buffer中加入无水乙醇并标记
	样品蛋白含量高	可相应稀释样品，增加蛋白酶K用量和消化时间
	样本pH值过低	调整样本pH到中性范围
	样本盐离子浓度较低	用5 M的NaCl调节盐离子浓度
回收结果不稳定	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
	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的枪头
阴性对照交叉污染	反应仓核酸污染	75%酒精擦拭反应仓，紫外灯照射30-60分钟
	阳性样本污染	阴性孔与高浓度阳性样本或待提取样本至少隔开一个孔位

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。