



## resDetect™ 残留DNA样本制备试剂盒 II（磁珠法）

货号：OPA-R024

规格：50 Preps

**重要提示：在进行实验之前请仔细阅读本手册。**

**本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。**

## 【产品信息】

残留 DNA 样本制备试剂盒可用于手动提取生物制药样本中的残留 DNA (residual DNA, resDNA)。同时, 可以利用自动化核酸提取设备配套本试剂盒对 resDNA 进行快速、高通量提取。使用本试剂盒纯化的 DNA 需与本司 resDetect™ HEK293/HEK293T/*Pichia pastoris* resDNA Quantitation Kit (qPCR) 配合使用。

在进行定量 resDNA 实验之前, 请使用该试剂盒对样本进行 DNA 提取。关于 resDNA 定量检测的产品信息, 请参阅相关 resDNA 定量检测试剂盒的用户指南 ([ACROBiosystems.com](http://ACROBiosystems.com))。

## 【方法原理】

本试剂盒采用磁珠法对生物制品中残留 DNA 进行分离纯化, 利用独特的缓冲体系、磁珠亲和吸附作用能有效去除蛋白质、盐离子等杂质, 从复杂基质中提取残留 DNA。使用本试剂盒提取纯化的 DNA 纯度高、质量稳定, 可用于下游的 qPCR 等检测。

## 【注意事项】

1. 使用前须仔细阅读此说明书, 请严格按照说明书操作。
2. 为有效提取样本中的微量 DNA, 需在操作过程中避免核酸降解或外源污染, 请严格控制环境、工具等引入的其他污染: 操作前后请进行台面清洁, 必要时使用核酸清除剂;
3. 操作人员须佩戴无粉手套、口罩等; 使用一次性无菌无核酸酶低吸附耗材, 建议使用带滤芯枪头。

## 【组分和存储】

本试剂盒可用于 50 次残留 DNA 样本的制备。

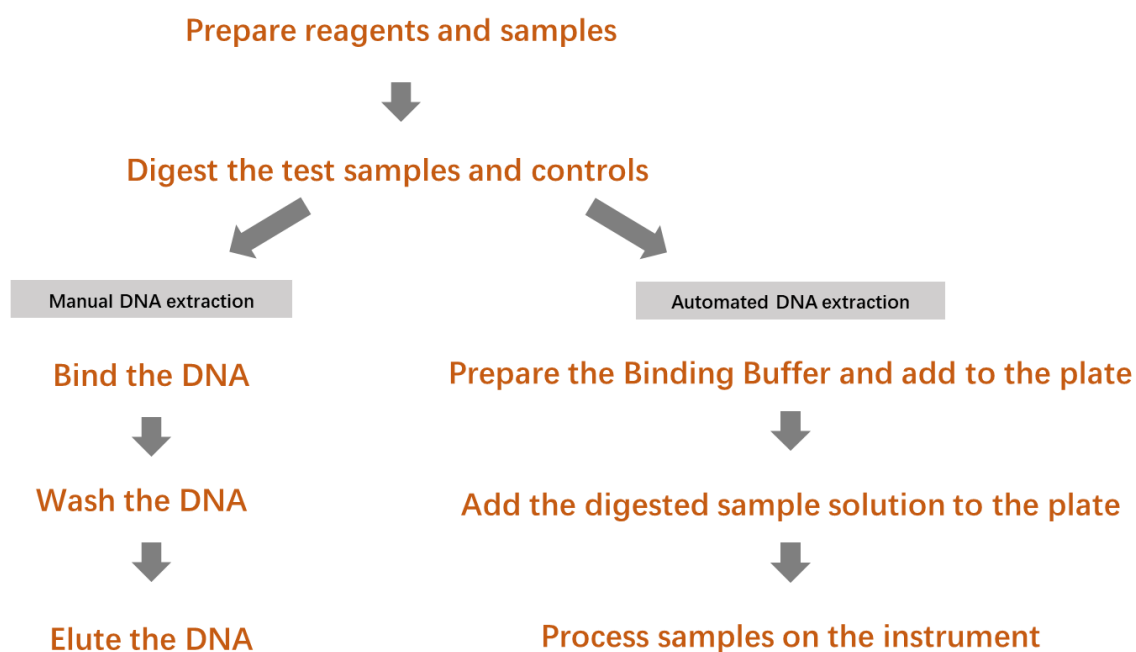
组分	装量	储存条件
保护液 NT (Buffer NT)	1.5 mL	常温 10~30°C 储存; 更优条件为: 蛋白酶 K 和磁珠悬浮液 MB 存放于 2~8°C。
裂解液 LA (Buffer LA)	1.5 mL	
裂解液 LB (Buffer LB)	24 mL	
蛋白酶 K (Proteinase K)	4 mL	
磁珠悬浮液 MB (MagBeads Suspension)	1.5 mL	
助沉剂 CR (CR Powder)	310 µg	
洗液 WA (Buffer WA)	38 mL	
洗液 WB (Buffer WB)	18 mL	
洗脱液 EB (Buffer EB)	6 mL	
样本稀释液	10 mL	

试剂盒自生产之日起可在常温 (10~30°C) 条件下储存 12 个月。若观察到裂解液、结合液和洗液中有沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液置于室温 (约 25°C) 下平衡一段时间, 或在 37°C 水浴中热 10 分钟以溶解沉淀。

**【实验所需自备试剂、耗材、设备】**

设备	Magnetic stand
	Block heater
	Mini centrifuge
	Vortex
	Automated extraction instrument
	Pipettors: P1000, P200, P100, P10
试剂	Isopropanol, 99.7%
	Ethanol, 99.7%
	1X PBS (free of Mg <sup>2+</sup> and Ca <sup>2+</sup> ) or 1×TE (pH7.0~pH8.0) as sample dilution buffer
	DNase/RNase-free ddH <sub>2</sub> O
耗材	Disposable gloves
	Nuclease-free, DNA-free aerosol-resistant pipet tips
	Low DNA-Binding Microcentrifuge Tubes (Nuclease-free, DNA-free), Deep-well plate, 8-Strip Tip Comb

**【实验流程】**



## 【试剂和样本准备】

### 试剂准备

1. 新开启 Buffer WA 需按照标签所示体积加入无水乙醇，充分混匀后使用。
2. 新开启 Buffer WB 需按照标签所示体积加入无水乙醇，充分混匀后使用。
3. 请提前将磁珠置于室温平衡 30 分钟，充分涡旋混匀后使用。
4. CR Solution 制备：将含有 310  $\mu\text{g}$  助沉剂 CR Powder 管瞬时离心，加入 310  $\mu\text{L}$  DNase/RNase-free ddH<sub>2</sub>O，涡旋混匀。若提取酵母类宿主 DNA，则无需使用 CR Powder。

### 注意事项：

(1) 若提取毕赤酵母 DNA，提取过程中则无需加入 CR Solution。

(2) 溶解后的助沉剂 CR Solution 需在 -20 °C 条件下保存，可将其分装成小份进行保存，避免反复冻融。

### 样本准备

#### 样本稀释（如果需要）

如果检测样本为生物制品工艺上中游样品，其中可能含有较高的 DNA 残留量。为确保检测的准确性，使样本的检测值在标准曲线线性范围之内，使用样本稀释液对样本进行倍比稀释 10~1000 倍，再进行下一步操作。1×PBS (free of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>) 或 1×TE (pH7.0~pH8.0) 可作为样本稀释液。

1. 若样本经过稀释，则用**样本稀释液作阴性对照**。
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；通常可将干粉样本稀释成 1 mg/mL~100 mg/mL。

## 【样本预处理】

1. 取 100  $\mu\text{L}$  样本加入 1.5 mL 或 2.0 mL 低吸附离心管中，分别取 22  $\mu\text{L}$  Buffer NT、70  $\mu\text{L}$  Proteinase K 和 25  $\mu\text{L}$  Buffer LA 加入离心管中，盖紧管盖涡旋振荡混匀；
2. 将离心管置于恒温混匀仪上 56°C，1000 rpm 孵育 30 分钟（建议**加热盖**），孵育完成后，瞬时离心，置于管架上平衡到室温；（若无恒温混匀仪，可使用恒温水浴锅进行孵育，每隔 10 分钟颠倒混匀 2~3 次）；

## 【手动 DNA 提取过程】（如使用自动化提取设备，请见第 6 页）

### DNA 结合

1. 向预处理完成后离心管中加入 400  $\mu\text{L}$  Buffer LB，**颠倒混匀**后涡旋振荡 1 分钟，瞬时离心。
2. 向以上离心管中分别加入 180  $\mu\text{L}$  异丙醇、25  $\mu\text{L}$  磁珠悬浮液 MagBeads Suspension（**吸取前需充分**

涡旋混匀)、3  $\mu\text{L}$  CR Solution (提取毕赤酵母 DNA, 无须添加), 立即盖紧管盖颠倒混匀数次, 涡旋振荡 1 分钟, 置于室温静置 10 分钟, 期间每隔 5 分钟涡旋振荡 30 s;

3. 瞬时离心后将离心管置于磁力架上静置 5 分钟, 待溶液澄清、磁珠完全吸附后用移液器小心移弃上清, **避免碰到磁珠**。

## DNA 漂洗

1. 向离心管中加入 700  $\mu\text{L}$  Buffer WA (使用前确认是否已加无水乙醇), 涡旋混匀约 10 s, 瞬时离心; 将离心管置于磁力架上静置 2 分钟, 待溶液澄清、磁珠完全吸附后用移液器小心移弃上清, 避免碰到磁珠;
2. 用 Buffer WA 按照上一步操作重复洗涤 1 次;
3. 加入 700  $\mu\text{L}$  Buffer WB (使用前确认是否已加无水乙醇), 涡旋混匀约 10 s, 瞬时离心; 置于磁力架上静置 2 分钟; 待溶液澄清、磁珠完全吸附用移液器小心移弃上清, **避免碰到磁珠**;
4. 再用 10  $\mu\text{L}$  移液器尽量吸净离心管 (置于磁力架上不能取下) 中残液, 避免碰到磁珠;
5. 将离心管继续保持在磁力架上, 室温晾干 2~5 分钟至磁珠表面无光泽无干裂, **防止过度干燥**;

### 注意事项:

1. 乙醇残留会抑制后续 PCR 反应, 要确保乙醇完全挥发; 同时避免干燥过度, 导致核酸难以洗脱;
2. 若需要达到更好的纯度, 可重复步骤 3) 一次再进入下一步。

## DNA 洗脱

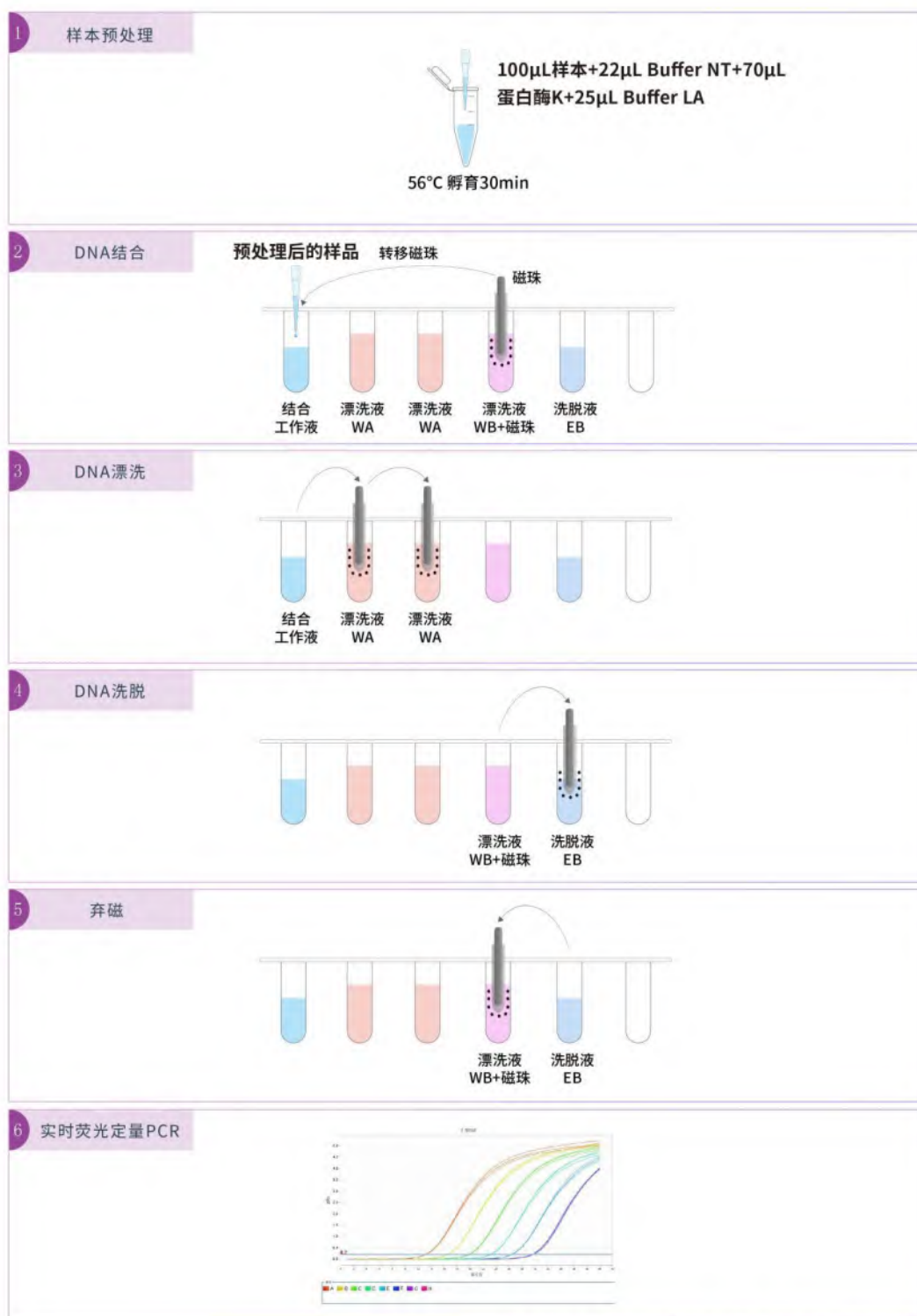
1. 加入 50~100  $\mu\text{L}$  Buffer EB, 用移液器轻轻吹打或涡旋振荡混匀 15~20 s 重悬磁珠, 将离心管置于恒温混匀仪上 70°C, 1000 rpm 孵育 10 分钟 (若无恒温混匀仪, 可使用恒温水浴锅进行孵育, 孵育期间每 2~3 分钟涡旋混匀 1 次);
2. 瞬时离心 15 s, 将离心管静置于磁力架上, 静置 2~5 分钟, 待溶液澄清用移液器小心吸取上清至新的 1.5 mL 低吸附离心管中进行保存 (**请避免吸到磁珠**); 洗脱后的 DNA 可用于下一步 qPCR 检测。

**注意事项:** 若 DNA 样本于 24 小时内进行 qPCR 检测, 可暂存于 2~8°C; 长期保存需置于 -20°C 中备用。

## 【自动化提取过程】

下述操作流程，适用于 **ACRO 自动化核酸提取仪** (Cat. No. OPE-32S)。

**注意:** 如使用其他品牌的自动化核酸提取设备，具体操作可参考此操作说明书，结合相关仪器设定，进行调整。



实验操作流程图

## 仪器准备

1. 仪器使用前，用 75%乙醇擦拭仪器工作腔。
2. 关闭盖门，打开紫外灯程序，用紫外灯照射 15 分钟。

## 结合工作液的准备和分装

1. 根据实际检测需求，准备结合工作液。由于结合工作液的制备和加样过程会有损耗，故计算用量时可增加一个样品损耗数，实际配置数  $N=n+1$ ，其中  $n$  为样品数。单个样品需要 Buffer LB 400  $\mu\text{L}$ +异丙醇 180  $\mu\text{L}$ +CR Solution 3  $\mu\text{L}$  共计 583  $\mu\text{L}$ 。配置方法如下：

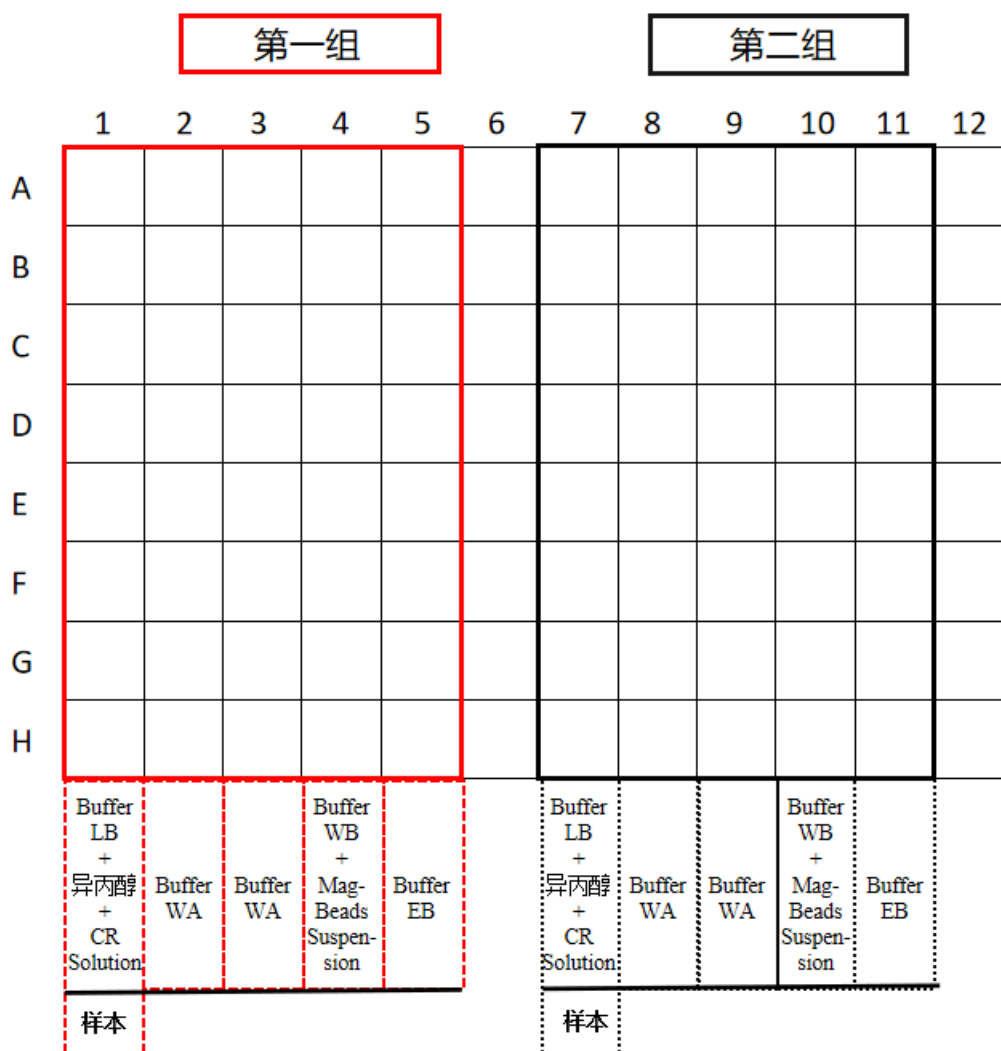
**注意事项：**若提取酵母 DNA，工作液中则无需加入 CR Solution。

Kit Reagents	Volume for 1 sample	Volume for Binding Buffer
Buffer LB	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L} \times N$
100% 异丙醇	180 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L} \times N$
CR Solution	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L} \times N$
<b>Total</b>	583 $\mu\text{L}$	583 $\mu\text{L} \times N$

2. 准备一个合适体积的 EP 管，按照上表加入对应体积的试剂后，充分震荡混匀。
3. 按照 **96 深孔板试剂分装示意图**将所需试剂加入深孔板中。
4. 在深孔板第 1 或者第 7 列加入结合工作液 583  $\mu\text{L}$  (Buffer LB 400  $\mu\text{L}$ 、异丙醇 180  $\mu\text{L}$ 、CR Solution 3  $\mu\text{L}$ )。
5. 在深孔板第 2 或者第 8 列加入 Buffer WA 700  $\mu\text{L}$ 。
6. 在深孔板第 3 或者第 9 列加入 Buffer WA 700  $\mu\text{L}$ 。
7. 在深孔板第 4 或者第 10 列加入 Buffer WB 700  $\mu\text{L}$ 、MagBeads Suspension 25  $\mu\text{L}$  (**磁珠加入前需充分涡旋混匀**)。
8. 在深孔板第 5 或者第 11 列加入 Buffer EB 100  $\mu\text{L}$ 。

**注意事项：**结合工作液分装前需充分混匀。试剂分装过程可使用多道移液枪利于快速操作。





96 深孔板试剂分装示意图

## 加样与上机

1. 将样本预处理（消化）后，离心管中全部液体加入到已分装试剂完成的深孔板**第 1 列**或者第 7 列中。
2. 将加样完成的深孔板放置到仪器固定位置，插入磁棒套，关闭仪器盖门，点击运行程序 **OPA\_R005**。（此程序已预设**在 ACRO 自动化核酸提取仪 OPE-32S 中**）  
**注意事项：**注意正确放置深孔板位置，注意检查磁棒套是否嵌入。
3. 程序运行完毕后，屏幕点击完成，取下磁棒套，取出深孔板，立即将第 5 列或者第 11 列中的 Buffer EB 移液至新的 1.5 mL 低吸附离心管或 PCR 管中进行保存，洗脱后的 DNA 可用于下一步 qPCR 检测。  
**注意事项：**若 DNA 样本于 24 小时内进行 qPCR 检测，可暂存于 2~8℃；长期保存需置于-20℃中备用。移液过程可使用多道移液枪利于快速操作。
4. 实验完成后，使用 75%乙醇擦拭仪器工作腔。关闭盖门，在主界面打开紫外灯程序，使用紫外灯照射 30 分钟。  
**注意事项：**建议两次实验间隔半小时以上，避免交叉污染。