

# 动物源性生物材料残留 DNA 提取试剂盒

## (磁珠法)

### 说明书

货号：1104193

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 试剂盒简介

动物源性生物材料残留 DNA 提取试剂盒（磁珠法）用于各种动物源性生物材料样品中的微量动物源 DNA 的提取纯化。本试剂盒适用于多种类型生物材料（如生物修复膜、生物补片、脱细胞基质等），有效提取纯化微量的 DNA，可用于 DNA 荧光染料法或 qPCR 方法检测。

本试剂盒可以根据以下内容进行手动操作，也可以通过 rHCDpurify®实现样品的自动处理。在 rHCDpurify®中已内置相应处理程序，参照 rHCDpurify®的说明书只需一键操作即可完成前处理。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	洗涤液 A	NND015	15 mL × 1 瓶	室温
	结合液	NND017	10 mL × 1 瓶	室温
	洗脱液	NND020	20 mL × 1 瓶	室温
	蛋白酶 K 缓冲液	NND025	5 mL × 1 瓶	室温
	1×PBS	NND042	5 mL × 1 瓶	室温
	DEPC 水	NND045	5 mL × 1 瓶	室温
II	磁珠	NND030	750 μL × 2 管	2-8 °C
III	蛋白酶 K	NND023	500 μL × 2 管	-18 °C及以下
	糖原	NND035	500 μL × 1 管	-18 °C及以下
	酵母 tRNA	NND037	50 μL × 1 管	-18 °C及以下

## ■ 规格

50 Extractions。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 无水乙醇(分析纯)
- 100%异丙醇 (分析纯)
- PCR 八联管或 96 孔板, 相应管盖或覆膜
- 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  无菌低吸附滤芯枪头
- 1.5 mL 无菌低吸附离心管

## ■ 相关设备

- 迷你离心机
- 天平 (0.0001 g)
- 磁性分离架和 rHCDpurify® 前处理系统
- 漩涡震荡器
- 恒温水浴锅
- 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  移液枪
- 荧光酶标仪或定量 PCR 仪
- 96 孔微孔板混匀仪

## ■ 实验操作流程

### 一、试剂、仪器准备

开启新试剂盒时需完成以下工作:

- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 20 mL 的无水乙醇。
- 在干净的试剂瓶中用无水乙醇和灭菌超纯水配制 70%乙醇溶液 50 mL, 标记为**洗涤液 B**。
- 配制后的洗涤液应密封, 室温保存, 防止乙醇挥发。

每次实验前需预先完成以下工作:

- 准备好 100%的异丙醇。
- 单份样品所需的蛋白酶 K 消化液的准备:

**20  $\mu$ L 蛋白酶 K + 100  $\mu$ L 蛋白酶 K 缓冲液 + 80  $\mu$ L DEPC 水**

- ✚ 蛋白酶 K 使用量参照样品的消化情况可酌情增加。
  - ✚ 按照上述单份样品的消化液用量和样品数, 计算和配制本次实验所需的蛋白酶 K 消化液总体积。
  - ✚ 使用前若发现蛋白酶 K 缓冲液出现结晶或沉淀, 应 37 °C 水浴, 待完全溶解后, 震荡混匀。
  - ✚ 蛋白酶 K 消化的完全程度会影响 DNA 的回收检测。
- 单份样品所需的工作结合液的准备:

**200  $\mu$ L 结合液 + 0.2  $\mu$ L 酵母 tRNA + 9  $\mu$ L 糖原**

- ✚ 如果提取的 DNA 使用 **Picogreen** 染料法进行检测, 工作结合液中不加酵母 tRNA。
- ✚ 按照上述单份样品的工作结合液用量和样品数, 计算和配制本次实验所需的工作结合液总体积。
- ✚ 使用前若发现结合液出现结晶或沉淀, 应 37 °C 水浴, 待完全溶解后, 震荡混匀。

## 二、样品处理

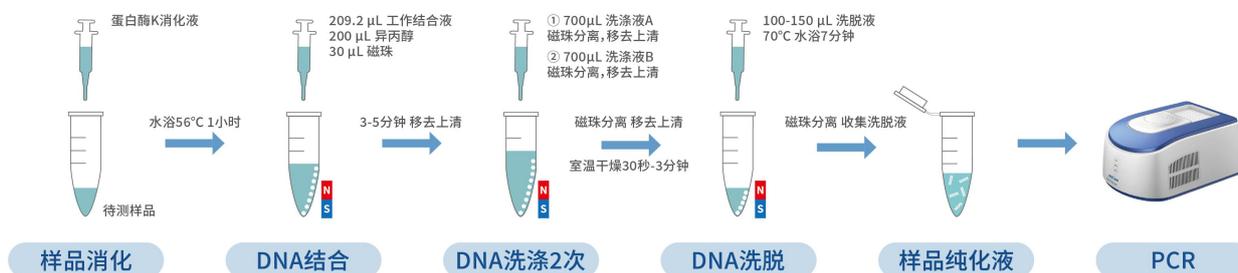
- **样品平行处理：**为了确保结果的准确性，可每个待测样品设置 3 个平行样品进行 DNA 提取处理和检测。
- **阴性质控（NCS）：**每次实验中都需要设置一个 NCS 作为空白样品，NCS 与其他待测样品一起进行处理，以检验在样品处理过程中是否存在交叉污染或环境污染。以 1×PBS 作为阴性质控。
- **加标回收（ERC）：**用 ERC 来评估 DNA 提取的效率、回收率和准确度，并可用 ERC 来评估验证分析方法和系统性能。对具体样品的 DNA 加标量设定在其无加标测试值的 2-10 倍为宜。建议针对样品进行预测试，初步确认样品中 DNA 残留量，以选择合适的取样量，也可作为后续设定加标量的依据。为了确保结果的准确性，每个待测样品可设置 3 个平行加标样品进行 DNA 提取和检测。
- ✚ 后续说明书中待测样品设置以：1 份未加标样品+1 份加标样品+1 份备用样品（基于损耗设置）共 3 份样品来进行设置。称量和消化液加入量都需 3 倍于单份样品的量。
- ✚ 如每个待测样品的未加标样品和加标样品都设置平行样品，所需样品数应为  $N+M+1$ ，其中  $N$  为未加标样品数， $M$  为加标样品数，1 为损耗。称量和消化液加入量都需  $N+M+1$  倍于单份样品的量。

## 三、样品消化

1. 每个待检测样品准确称量 3 倍于单份样品的称样量并记录，剪成尽量小的碎片后放入同一管 1.5 mL DNase-free 无菌离心管中。
  - ✚ 单份样品的称样量可由预测试结果确定。从样品检测值尽量接近方法上限或位于方法线性范围内为宜。
  - ✚ 对于经交联剂处理过不易被酶类消化的样品，则充分匀浆后放入 1.5 mL DNase-free 无菌离心管中。
  - ✚ 对于湿润性样品，取与待验组相同重量样品，并记录湿重，完全干燥至恒重后计算含水量计算干重，用于后续结果计算。
2. 加入 3 份蛋白酶 K 消化液振荡混匀后，56 °C 水浴 1 小时（样品完全融解，无肉眼可见颗粒）。

## 四、DNA 提取

### (一) 操作过程 (手工操作)



#### ◆ 结合

1. 从水浴中取出样品，涡旋混匀后分出 2 份，每份 200  $\mu\text{L}$ ，剩余样品舍弃，1 份作为样品组，1 份作为加标回收组，根据预实验加入合适的加标量。
2. 加入**工作结合液**，振荡混匀。
3. 快速离心 10 秒后在每份样品混合物中分别加入 200  $\mu\text{L}$  **异丙醇**，30  $\mu\text{L}$  **磁珠**。  
 ✚ 磁珠使用前应在漩涡振荡器充分振荡 5 秒。  
 ✚ 如果样品较多，每次加入磁珠过程中应再次充分震荡混匀磁珠，以保证每次加入的磁珠量的一致性。
4. 将装有全部混合物的离心管置于漩涡振荡器上振荡 5 分钟，快速离心 10 秒后静置于磁性分离架上。  
 ✚ 快速离心的目的在于将附着在离心管盖和壁上的混合物甩至管底。
5. 待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头小心移去上清。  
 ✚ 等待磁珠完全分离的时间约为 3-5 分钟。  
 ✚ 去除上清时枪头避免搅动磁珠，避免磁珠同上清一起被去除。

#### ◆ 洗涤

1. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700  $\mu\text{L}$  **洗涤液 A**，振荡 10 秒使磁珠和洗涤液 A 混匀；快速离心 10 秒后，将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 1 次磁珠洗涤。
2. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700  $\mu\text{L}$  **洗涤液 B**，振荡 40 秒使磁珠和洗涤液 B 混匀；快速离心 10 秒后，将离心管重置于磁性分离架上。

待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 2 次磁珠洗涤。

3. 为保证液体充分移除, 可将离心管再次快速离心 10 秒, 置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 用 10  $\mu$ L 枪头小心的将残余液体吸除干净。

 去除上清时枪头避免搅动磁珠, 避免磁珠同上清一起被去除。

4. 从磁性分离架上取下离心管, 打开管盖在室温下干燥 30 秒-3 分钟, 除去残留的乙醇。

 干燥时间不可过长, 室温较高或空气干燥的环境下可以适当缩短干燥时间, 残留乙醇会影响下一步的检测反应。

#### ◆ 洗脱

1. 沿离心管壁加入 100-150  $\mu$ L 70  $^{\circ}$ C 预热的**洗脱液**, 用漩涡振荡器轻微振荡 5 秒使磁珠和洗脱液混匀, 70  $^{\circ}$ C 水浴 7 分钟, 水浴过程中可再次振荡混匀 2-3 次。

 振荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。

 振荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新震荡混匀。

2. 孵育完成后, 将离心管高速离心 1 分钟, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头小心转移溶液到干净的离心管中。

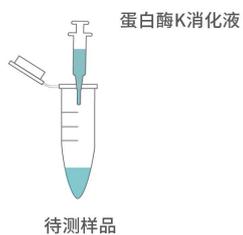
3. 将上一步获得的离心管快速离心 10 秒, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头再次转移溶液到干净离心管, 所得即为样品纯化液。

 收集洗脱液时, 应将离心管内溶液转移完全, 离心管内不得残留液体, 否则将影响样品检测的准确性。

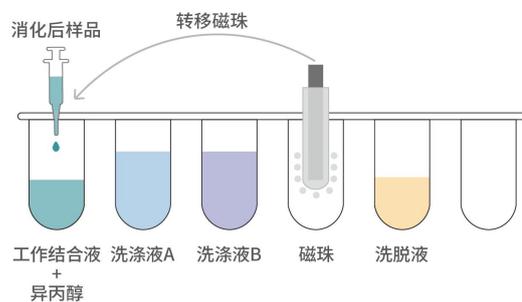
 若样品残留较高, 可用洗脱液将纯化液进行适当稀释, 使其检测值落在标曲范围以内。

## (二) 操作过程 (rHCDpurify®前处理系统)

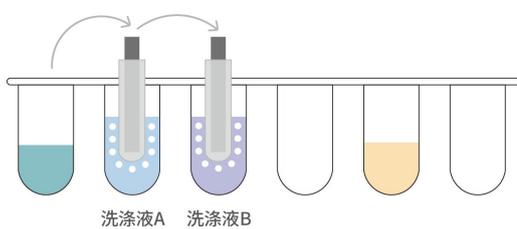
### ① 样品消化



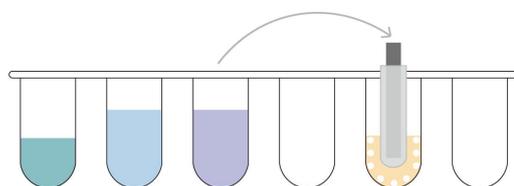
### ② DNA结合



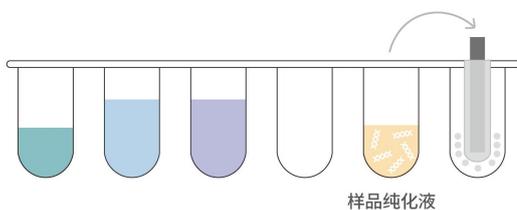
### ③ DNA洗涤



### ④ DNA洗脱



### ⑤ 磁珠归位



### ⑥ PCR



◆ 提取准备

按照下述 96 深孔板排布预先加入相应溶液：

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1											
S2						S1 ERC					
S3						S2 ERC					
S4						S3 ERC					
S5						S4 ERC					
S6						S5 ERC					
						S6 ERC					
NCS						PCS					
工作结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	工作结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/
样品						样品					

其中：

第 1 或 7 列：工作结合液 209.2 μL/孔，异丙醇 200 μL/孔，消化后的全部样品

第 2 或 8 列：洗涤液 A 700 μL/孔

第 3 或 9 列：洗涤液 B 700 μL/孔

第 4 或 10 列：磁珠 30 μL/孔

第 5 或 11 列：洗脱液 150 μL/孔

🚦 样品可在其他试剂全部加完后再加。

### ◆ 程序启动

1. 电源键打开—点击“登录”输入账号及密码—进入主界面。
2. 75%酒精棉球擦拭仪器内壁—点击“紫外灯”—选择“15 分钟”。  
 此步骤可在提取准备操作之前进行。
3. 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置，并把塑料套管插入磁头对应位置。
4. 点击“运行”—选择“rHCD-193”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行。
5. 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化液全部转移到新的离心管内。

## 注意要点

1. 建议将实验室内部进行分区, 分为阴性区 (阴性对照样品处理、PCR 试剂的配制、阴性模板加样)、阳性区 (样品操作)、扩增区等, 做好明显的标识。每个区域配备独立的设备、试剂及耗材, 不得交叉使用。实验试剂、待测样品、PCR 产物应分开存放, 不应放于同处。减少在实验区内不必要的走动, 以降低污染发生概率。
2. 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 °C。
3. 实验过程中选择最合适尺寸的手套并及时更换, 在不同实验区域或进行模板操作后都应更换实验服、口罩、帽子及手套, 以避免不同实验区域交叉污染。
4. 装有试剂的离心管在打开之前应先瞬时离心, 将管壁及管盖上的液体离至管底, 降低污染手套或移液枪的风险; 谨慎开关反应管, 防止管内液体溅出或形成气溶胶导致污染。
5. 使用过的枪头及废液必须经过消毒液浸泡消毒后, 在远离实验室的场所丢弃或统一处理。
6. PCR 扩增完成后, 需戴上一次性手套将 PCR 管取出, 观察管盖是否紧闭, 管壁有否破裂, 确保产物没有外漏, 之后丢弃在指定处, 严禁开盖。
7. 在磁性分离架上分离磁珠时, 过程中可缓慢旋转离心管, 加速磁珠聚集。
8. DNA 洗涤和洗脱操作时, 每次振荡混匀后, 都应该瞬时离心, 以保证没有磁珠或液体附着于离心管盖或管壁上。
9. 在去除乙醇干燥时, 观察磁珠状态, 勿让磁珠太干, 以免洗脱时不完全溶解。
10. 请尽量在完成样品纯化处理当天进行后续的 DNA 检测, 以保证检测结果的准确性。
11. rHCDpurify 程序启动前, 检查 96 深孔板和套管是否固定好。
12. rHCDpurify 仪器工作前及完成后需要紫外灭菌至少 15 分钟, 并使用 75%酒精棉球将仪器内壁擦拭干净。且两次提取实验间隔至少为 30 分钟。
13. rHCDpurify 程序运行完毕后, 需立即取出 96 深孔板并将洗脱液转移至新的离心管。96 深孔板第 5 或第 11 列壁上可能会出现冷凝水珠, 该现象不会影响提取效果, 只需将底部洗脱液转移出来即可, 且保证多于 40  $\mu\text{L}$ , 确保检测时所需。

## 常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
纯化回收率低	洗涤液 A 中未加入无水乙醇。	按照说明书预先在洗涤液 A 中加入无水乙醇。
	洗涤后磁珠过干,影响 DNA 洗脱。	磁珠干燥时间不要过长,室温较高或空气干燥的环境下 30 秒-1 分钟即可,室温较低或空气湿润环境下,干燥 1-3 分钟。
	洗脱时磁珠附着于管壁,洗脱液与磁珠未能充分混匀。	将已加入洗脱液的离心管置于漩涡震荡器上振荡,使磁珠从管壁上脱落且与洗脱液混匀;如操作后磁珠仍附着于管壁,可将离心管 70 °C 水浴 2 分钟后于漩涡震荡器上振荡,直至磁珠与洗脱液混匀。
	样品蛋白含量高。	可相应增加蛋白酶 K 用量和消化时间。
	洗涤过程中磁珠有损失。	洗涤过程中如发现磁珠吸附位置太过靠近管底,可轻柔吹打几次,使管底磁珠往上吸附。
回收结果不稳定	磁珠保存于-18 °C 及以下导致磁珠性能下降。	在 2-8 °C 保存磁珠。
	加标不准确或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枪头。
	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。

修订日期：2023 年 05 月 18 日

生效日期：2023 年 06 月 01 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：0572-2165910