



版本号：TRS0207-V1

宿主细胞残留 DNA/RNA 样品前处理试剂盒 说明书(磁珠法) II-R

货 号：

TRS0207-100 (100T)

TRS0207-020S (20T)



一、预期用途

宿主细胞残留 DNA/RNA 样品前处理试剂盒(磁珠法) 适用于生物制品样品的核酸提取前处理, 具备支持多种基质的缓冲液, 可稳定高效地提取样品中的微量宿主细胞 DNA/RNA。

该试剂盒可与宿主细胞残留 DNA/RNA qPCR 检测试剂盒配套使用。

二、产品原理

该试剂盒基于磁珠法检测原理, 能从生物制品样品中分离出残留 DNA/RNA。蛋白酶 K 消化样品, 在一定条件下磁珠与 DNA/RNA 特异性结合, 利用磁性分离器分离磁珠与溶液, 洗涤去除杂质, 最后用洗脱液使磁珠释放吸附, 得到高纯度的 DNA/RNA。整个过程安全便捷, 无需酚/氯仿等试剂。

三、试剂盒规格及组分

序号	组分名称	TRS0207-100 (100T)	TRS0207-020S (20T)	保存
Box I	蛋白酶 K Buffer IIR	8mL	1.5mL	RT
	裂解液 II	50mL	10mL	RT
	清洗液 AR	70mL	15mL	RT
	清洗液 BR	21mL	4.5mL	RT
	洗脱液 R	15mL	3mL	RT
	P 磁珠*	3.5mL	700 μ L	2~8 $^{\circ}$ C
Box II	蛋白酶 K (20mg/mL)	2mL	400 μ L	-20 \pm 5 $^{\circ}$ C
	5M NaCl R	1.5mL	400 μ L	-20 \pm 5 $^{\circ}$ C
	糖原 R	1mL	200 μ L	-20 \pm 5 $^{\circ}$ C
	tRNA	50 μ L	10 μ L	-20 \pm 5 $^{\circ}$ C

*P 磁珠常温运输, 2~8 $^{\circ}$ C 储存。

四、储存条件及有效期

Box I 常温运输，收货后 P 磁珠 2~8℃ 储存，其他常温储存；

Box II 干冰或冰袋运输，收货后低温 -20±5℃ 储存；

试剂盒收货后有效期 1 年。

五、相关设备、耗材及试剂

一次性无尘手套、1.5mL 无菌低吸附离心管、磁力架/全自动磁珠提取仪、移液器、10 μL 枪头、20 μL 枪头、100 μL 枪头、200 μL 枪头、1000 μL 枪头、涡旋混匀仪、小型离心机、恒温混匀仪、超净台、无水乙醇、异丙醇、DNA 酶（如需）、RNA 酶（如需）。

六、实验流程

1. 缓冲液制备

- a) 首次使用试剂盒前，向清洗液 BR 中加入标签指定量的无水乙醇，如 21mL 的清洗液 BR 中加无水乙醇 49mL，4.5mL 的清洗液 BR 中加无水乙醇 10.5mL，并在标签的口上打√做好标记
- b) 准备异丙醇
- c) 将低温 -20±5℃ 储存试剂解冻
- d) 根据样品量，提前配制**蛋白酶 k/蛋白酶 k Buffer IIR**：

试剂	每次反应加入量
蛋白酶 k 20mg/ml	10 μL
蛋白酶 k buffer IIR	60 μL

- e) 根据样品量，提前配制**裂解/结合液**：

试剂	每次反应加入量
裂解液 II	351.5μL
糖原 R	8.3μL
tRNA*	0.2μL

2. 样品处理、仪器准备

- a) 冷冻样品应提前置于 2~8℃ 条件下自然解冻，待完全解冻后，方可取样。
- b) 建议样品解冻后，室温下 12000 × g 离心 10min，去除冷冻沉淀物。
- c) 如果样品为干粉，需要溶解到 10-100mg/ mL (100 μL 提取，绝对蛋白含量 1-10mg) 后再进行样品纯化处理。
- d) 高浓度蛋白样品需要稀释到 10-100mg/ mL (100 μL 提取，绝对蛋白含量 1-10mg) 后再进行样品纯化处理。
- e) 如果 PH<5 或者 PH>9，需要用 HCl 或者 NaOH 调节 PH 到 6~8 后，再行实验。
- f) 如果是前期样本，RNA 浓度一般比较高，需要稀释样本到最终 DNA/RNA 总产量小于 100ng。
- g) 若使用前发现蛋白酶 K Buffer IIR 出现`结晶或沉淀，应 37℃ 水浴处理，待完全溶解后，振荡混匀。
- h) 提前开启恒温混匀仪，设置温度 57℃。
- i) 如果需要提取 RNA 作为后续实验，实验操作、试剂准备全部严格按照 RNA 实验操作实施。

3. 操作方法(手工提取)

- a) 在开始提取程序前，将各组分试剂置于室温，振荡混匀。
- b) 取 100μL 待测样品溶液，加入 10μL 5M NaCl R、70μL 蛋白酶 K/蛋白酶 K Buffer IIR，至 1.5mL 离心管，涡旋混匀 5s。

***如果后期是定量 RNA, 该步需要加入 DNA 酶 5ul 混匀, 37 度孵育 10 分钟后加入蛋白酶 k 混合液;**

***如果后期是染料法定量 DNA, 该步需要加入 RNA 酶 5ul 混匀, 37 度孵育 10 分钟后加入蛋白酶 k 混合液。**

- c) 离心管置于恒温混匀仪上，57℃ 孵育 15min (如果样本蛋白浓度较高，消化后不透明，可将孵育时间增加到 30min)。
- d) 取下离心管，加入 360 μL 裂解/结合液，涡旋混匀 5s，室温放置 15min。
- e) 将 P 磁珠完全重悬，向离心管中加入 400μL 异丙醇、30μL P 磁珠悬浮液，涡旋混匀 5s。
- f) 离心管置于恒温混匀仪上，室温下 1200 rpm 混匀 5min。
- g) 离心管 15000×g 离心 5s，将离心管置于磁力架上静置 2~5min，待磁珠完全被吸附后，在不干扰磁珠的情况下，使用移液器去除上清液。

- h) 向离心管中加入 300 μ L 清洗液 AR, 涡旋混匀 15s, 15000 \times g 离心 5s 后置于磁力架上静置 2~5min, 待磁珠完全被吸附后, 在不干扰磁珠的情况下, 使用移液器去除上清液。
- i) 向离心管中加入 300 μ L 清洗液 BR, 涡旋混匀 15s, 15000 \times g 离心 5s 后置于磁力架上静置 2~5min, 待磁珠完全被吸附后, 在不干扰磁珠的情况下, 使用移液器去除上清液。
- j) 将离心管瞬时离心后, 置于磁力架上, 吸弃管底部残留的洗涤缓冲液。打开管盖, 室温干燥 30s~5min, 除去残留乙醇。(注: 乙醇残留会影响后续实验, 晾干时要确保乙醇挥发干净, 但也不可过于干燥, 否则核酸将很难溶解。)
- k) 加入 50-100 μ L 洗脱液 R, 涡旋混匀 15s 重悬磁珠, 置于恒温混匀仪上, 70 $^{\circ}$ C 1200rpm 混匀 5min。
- l) 离心管瞬时离心后, 置于磁力架上约 30s (若离心管壁附着磁珠, 用离心管内的洗脱液冲洗管壁上的磁珠), 待磁珠完全吸附, 小心地将溶液转移至干净的离心管中。纯化的 DNA/RNA 可立即使用, 也可 80 $^{\circ}$ C 长期储存。(注: 请勿吸入磁珠, 磁珠残留会干扰后续实验。)

4. 操作方法(提取仪)

- a) 在开始提取程序前, 将各组分试剂置于室温, 振荡混匀。
- b) 取 100 μ L 待测样品溶液, 加入 10 μ L 5M NaCl R、70 μ L 蛋白酶 K/蛋白酶 K Buffer II R, 至 1.5mL 离心管, 涡旋混匀 5s。
***如果后期是定量 RNA, 该步需要加入 DNA 酶 5ul 混匀, 37 度孵育 10 分钟后加入蛋白酶 k 混合液;**
***如果后期是染料法定量 DNA, 该步需要加入 RNA 酶 5ul 混匀, 37 度孵育 10 分钟后加入蛋白酶 k 混合液。**
- c) 离心管置于恒温混匀仪上, 57 $^{\circ}$ C 孵育 15min (如果样本蛋白浓度较高, 消化后不透明, 可将孵育时间增加到 30min)。
- d) 取下离心管, 加入 360 μ L 裂解/结合液, 涡旋混匀 5s, 室温放置 15min。
- e) 将 P 磁珠完全重悬, 向离心管中加入 400 μ L 异丙醇、30 μ L P 磁珠悬浮液, 涡旋混匀 5s。
- f) 在第二列或第八列中加入 300 μ L 清洗液 AR。
- g) 在第三列或第九列中加入 300 μ L 清洗液 BR。
- h) 在第六列或第十二列中加入 100 μ L 洗脱液 R。
- i) 在第一列或第七列中加入步骤 e) 消化后的全部样品。
- j) 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置。
- k) 把塑料磁力套插入相应位置。

- l) 点击“运行”相应程序。
- m) 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化产物全部转移到新的离心管。纯化的 DNA/RNA 可立即使用，也可-80°C 长期储存。

	第一组						第二组					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1						S1 ERC					
B	S1						S1 ERC					
C	S2						S2 ERC					
D	S2						S2 ERC					
E	S3						S3 ERC					
F	S3						S3 ERC					
G	NCS						PCS					
H	NCS						PCS					
	样品 消化产物	清洗 液 AR	清洗 液 BR			洗脱 液 R	样品 消化产物	清洗 液 AR	清洗 液 BR			洗脱 液 R

注：根据不同的机型可以调整相应试剂位置及体积，运行对应程序。

七、注意事项

- a) 若蛋白酶 K Buffer IIR 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- b) 实验操作过程中，轻轻打开管盖，勿将液体溅出。
- c) 在提取 DNA/RNA 之前，用 1X PBS(不含 Mg²⁺和 Ca²⁺)或 50 mM Tris(pH 8.0, 0.5 M NaCl)溶液稀释测试样品，在水中或 TE 中稀释样品会降低提取效率。
- d) 磁珠在静置后会发生沉降，使用前务必使磁珠与溶液充分混匀，磁珠聚集对于提取的得率与纯度均有较大影响。
- e) 样品前处理完成后，请尽量当天进行后续 DNA/RNA 残留检测，以保证检测结果的准确性。
- f) 本产品仅供一次性使用，用后按《医疗卫生机构医疗废物管理办法》或其它相关法律法规处理。



八、预防 RNase 污染，需注意以下几点：

- a) **频繁更换新手套：**因人体皮肤表面附着有各类细菌，经常更换新手套，可最大限度减少外源 RNase 污染风险。
- b) **选用无 RNase 的耗材：**实验中所用到的塑料制品与枪头，采用无 RNase 的产品，可杜绝因耗材携带 RNase 而造成样本间的交叉污染。
- c) **规范器皿处理：**在 RNA 提取环节，样本处于裂解液中时，能免受 RNase 的降解威胁；但后续处理流程中，需留意所用器皿。玻璃器皿需要在 150°C 高温条件下烘烤 4 小时，塑料器皿则应放置于 0.5 M 的 NaOH 溶液中浸泡 10 分钟，随后用大量清水彻底冲洗干净，最后再进行灭菌处理，经过这般严格操作，才能彻底消除器皿上附着的 RNase。
- d) **正确配制溶液：**溶液配制务必使用 RNase-Free 的超纯水。具体操作是，先把水注入干净无菌的玻璃瓶，接着添加 DEPC，使其终浓度达到 0.1% (v/v)，充分混匀后静置过夜，最后采取高压灭菌处理，由此获得无 RNase 污染的实验用水。

九、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

