

描述: Benzonase 可高效降解任何形式的核酸, 广泛用于蛋白等生物制品中核酸的去除。在处理过的生物制品中, 可能存在微量 Benzonase 残留, 这些微量残留会对后续生物制品的应用造成一定的影响。生物制品中 Benzonase 的残留量是衡量生物制品质量的重要指标之一。目前, Benzonase 核酸酶残留检测多基于免疫吸附 ELISA 的检测方法, 由于其方法自身的限制, 测量并不准确, 主要体现在以下方面: (1) 检测抗体的亲和性能差异大, 受环境影响大; (2) 检测抗体的非特异性交叉反应; (3) 生物制品本身蛋白浓度差异, 造成的亲和和吸附差异。

HaiGene 全新研发的基于荧光探针的 Benzonase 核酸酶残留检测方案, 成功避开以上缺点, 实现了高重复性、高准确度、高灵敏度检测。在无 Benzonase 核酸酶的样品中, 该探针是稳定存在的, 不会产生荧光信号; 含有核酸酶残留的样品中, 核酸酶可将荧光标记的 DNA 探针切割, 从而产生逐渐增强的荧光信号。该方法可检测 1.5~50ng/ml 的核酸酶残留, 操作简单, 只需加入 Benz Detection Solution 和待检样品, 在定量 PCR 仪上 15min 内即高准确度完成检测。

组份:

名称	50T
2× Benz Detection Solution	1ml
标准品 A (25ng/ml)	100μl
标准品 B (12.5ng/ml)	100μl
标准品 C (6.3ng/ml)	100μl
标准品 D (3.1ng/ml)	100μl
标准品 E (1.5ng/ml)	100μl
样品稀释液	1.5ml

应用:

重组蛋白或其它生物制品中的核酸酶残留检测。

特别注意事项:

该制品仅限于 HaiGene 生产的 Benzonase 核酸酶 (C2001-C2004), 其它供应商生产的制品, 可能不适用, 无法提供数据支持。

保存:

-20℃保存 6 个月, -80℃保存 18 个月。

1. 准备工作

1.1 由于 Benzonase 核酸酶消化迅速, 在进行检测操作前务必将定量 PCR 仪的程序、样品编号提前设置完毕, 检测操作完成后立即上机检测。

1.2 所有试剂, 室温融化待用, 实验完成后所有试剂再放置于-20℃或-80℃保存。

2. 检测操作

2.1 样品准备

首次检测, 可将待检测样品用样品稀释液稀释 2 倍、5 倍、10 倍后备用。稀释倍数取决于样本中 Benzonase 核酸酶的残留水平。

2.2 荧光定量 PCR 仪设置

关掉定量 PCR 仪的热盖功能, 反应体积 40μl。			
Step 1	37℃	10s	40 cycles
Step 2	37℃	20s	

定量 PCR 仪的热盖功能设置, 不同机型可能不同, 如不熟悉设置功能, 可联系设备供应商询问。

2.3 加样操作

(1) 在每一个 0.2ml EP 管底部 (建议采用 8 联管或 96 孔板) 加入 20μl 标准品或待检测样品 (见实验排表 1)。

(2) 所用样品加完后, 快速的在每个样品中加入 20μl 2×Benz Detection Solution, 盖上管盖或膜。手腕用力将样品甩至管底。(本步操作请尽可能快, 通常 45s 内完成, 缓慢的操作, 将影响检测结果准确性), 然后迅速将检测样品放置 PCR 仪上运行。

表 1 实验操作工作表

	用途	用量	用途
管 1	样品稀释液	20μl	阴性对照
管 2	标准品 A (25ng/ml)	20μl	标准曲线
管 3	标准品 B (12.5ng/ml)	20μl	标准曲线
管 4	标准品 C (6.3ng/ml)	20μl	标准曲线
管 5	标准品 D (3.1ng/ml)	20μl	标准曲线
管 6	标准品 E (1.5ng/ml)	20μl	标准曲线
管 7	检测样品原液	20μl	浓度测定
管 8	检测样品稀释 2 倍产物	20μl	浓度测定
管 9	检测样品稀释 5 倍产物	20μl	浓度测定
管 10	检测样品稀释 10 倍产物	20μl	浓度测定

3. 数据处理

3.1 读取荧光信号值

该方案不同于标准定量 PCR 的数据处理方法，并不是去读取相同荧光值下的 Ct 值，而是读取在固定时间点的荧光信号（对数形式）。通常可读取 5min (Ct10) ~10min (Ct30) 之内的数值，通常读取 8min 时间点的荧光信号值，即 Ct16 的荧光信号值。以下为使用 BioRad-Opticon2 机型进行检测的结果。

图 1：反应曲线

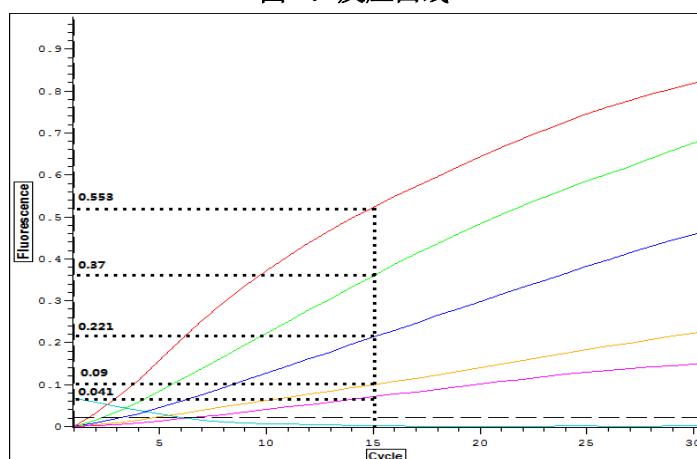


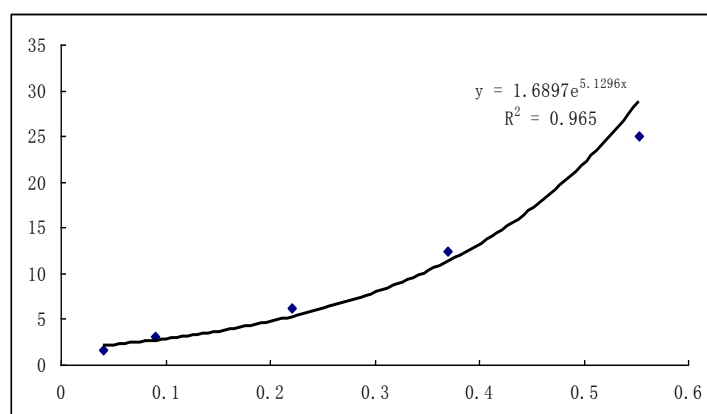
表 2 检测结果

管	用途	荧光值
管 1	样品稀释液	---
管 2	标准品 A (25ng/ml)	0.553
管 3	标准品 B (12.5ng/ml)	0.37
管 4	标准品 C (6.3ng/ml)	0.221
管 5	标准品 D (3.1ng/ml)	0.09
管 6	标准品 E (1.5ng/ml)	0.041
管 7	检测样品	X

3.2 根据标准品荧光信号值制作标准曲线

采用 Excel 进行标准曲线制作，采用幂函数，X 轴为荧光信号值，Y 轴为标准品浓度。

图 2 标准曲线



3.3 计算检测样本中 Benzonase 含量

根据标准曲线中的计算公式，将检测样品的荧光值(x 轴)换算成 Benzonase 核酸酶残留量 (ng/ml, y 轴)。

$$\text{Benzonase 含量 (y)} = \text{稀释倍数} \times 1.6897e^{5.1296x}$$

数据处理中的注意事项

- 通常样本中 Benzonase 核酸酶残留量低于标准品 F (1.5ng/ml) 时，无法检出。报告形式为 Benzonase 核酸酶残留量 < 1.5ng/ml。
- 检测样品稀释后产物的荧光值仍然高于标准品 A (25ng/ml) 的荧光信号值，则需要将样本继续稀释后再进行检测。
- 不同的荧光 PCR 机型，可能在数据表现形式上存在差异，但原则不变，原理为短时间内的荧光增加量代表 Benzonase 核酸酶含量。
- 如果您对数据处理比较疑惑，可将结果发送至我处，有我处协助数据处理。