

DNase I 性能验证报告

实验一：验证 DNase I 中 有无 RNase 残留

- 样品类型：细菌培养液（富含 RNA）。
- 样品用量：25ul
- 提取方法：磁珠法
- 洗脱体积：50ul
- 提取时间：120 分钟（暂停程序后放置 60 分钟）
- 检测方法：Nanodrop 和电泳

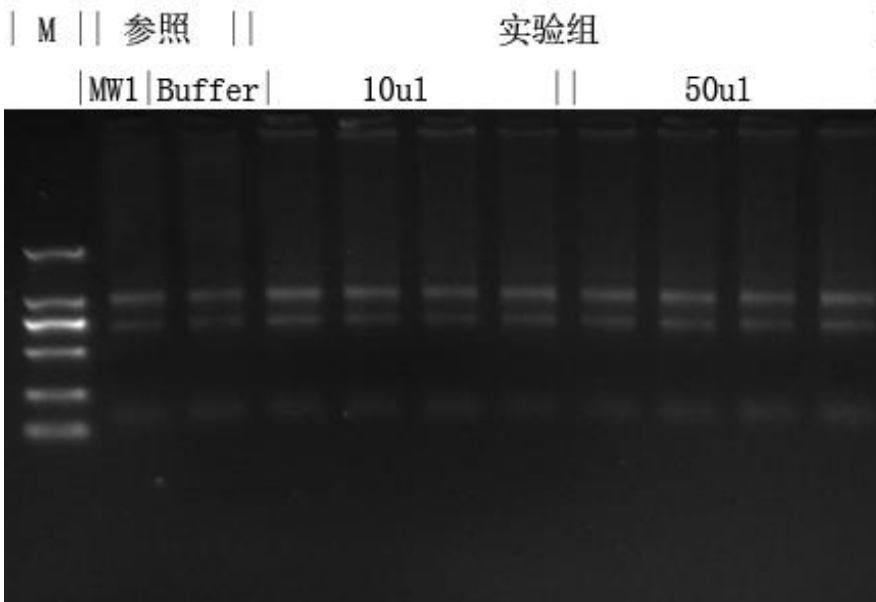
实验数据：

Nanodrop 数据：

样品名称		加入 DNase 量 (ul)	核酸(ng/ul)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
参照组	MW1	0	32.809	1.640	1.866	0.824
	DNase Buffer		28.962	1.448	2.038	1.201
实验组	10		30.808	1.540	1.873	0.926
			30.982	1.549	2.036	1.116
			30.068	1.503	1.996	1.025
			31.905	1.595	1.978	1.014
	50		33.045	1.652	1.840	0.819
			33.051	1.653	1.841	0.836
			31.688	1.584	1.814	0.797
			32.680	1.634	1.756	0.754

电泳图：

RNase残留实验-提取细菌RNA



实验结论：

1. 从电泳图可看出，RNA 有两个完整的条带。核酸洗脱至 DNase I 孔后暂停程序取出放置 1 小时，使残留的 RNase 充分起作用；最后核酸仍不降解，因此证明 DNase I 中无 RNase 残留。

实验步骤：

1. 称取 25ul 细菌培养液 13000× g 离心 1min 后倒弃培养基，加入 100ul P1+5ul lysozyme 涡旋混匀。
2. 室温放置 10min，13000× g 离心 1min，弃液。
3. 加入 400ul RL 剧烈涡旋打散样品。
4. 取上清过 DNA 柱，收集滤液，弃柱。（去除 DNA）
5. 取 500ul 滤液加入至 96 孔板样品板中。
- 6.

结合孔 (1/7)	500ul 滤液，30ul MagPure Particles, 450ul Buffer MCB
清洗孔 1 (2/8)	600ul Buffer MW1
DNase I (3/9)	300ul DNase Buffer + 10/50ul DNase 暂停后取出室温放置 1h，再加入 450ul Buffer MCB 参照：300ul DNase Buffer 参照：600ul Buffer MW1（暂停时不补加）
清洗孔 2 (4/10)	600ul Buffer MW2
清洗孔 3 (5/11)	600ul Buffer MW2

洗脱液 (6/12)	50ul Elution Buffer
------------	---------------------

实验运行程序:

步骤	孔位	实验名称	等待时间	混合时间	吸磁次数	混合速度	容积	温度状态	温度
1	1	Bind	0	6	2	快	900	关	0
2	2	W1	0	2	1	快	600	关	0
3	3	消化	3	10分钟	0	中	600	关	0
4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
暂停时取出, 放置 60 分钟再加入 450ul MCB. 延长时间让残留的 RNase 充分起作用。									
5	3	Bind	0	6	1	快	600	关	0
9	4	W1	0	1	1	快	600	关	0
10	5	W2	0	1	1	快	600	关	0
11	6	Elute	6	6	2	快	50	关	0
12	5	Remove	0	1	0	快	600	关	0

实验二：验证 DNase I 去除 DNA 效果

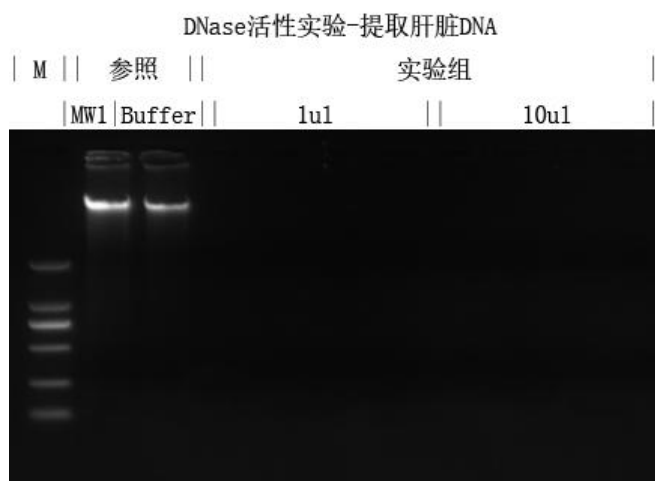
- 样品类型：肝脏匀浆液.
- 样品用量：20mg
- 提取方法：磁珠法
- 洗脱体积：50ul（对照组用 100ul 溶解）
- 提取时间：60 分钟
- 检测方法：Nanodrop 和电泳

实验数据：

Nanodrop 数据：

样品名称		加入 DNase 量 (ul)	核酸(ng/ul)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
参照组	MW1	0	294.253	29.425	1.851	1.876
	DNase Buffer		170.671	17.067	1.829	1.559
实验组		1	25.760	1.288	1.767	0.539
			25.780	1.289	1.764	0.564
			26.241	1.312	1.765	0.533
			25.984	1.299	1.766	0.534
		10	22.219	1.111	1.730	0.513
			22.543	1.127	1.713	0.499
			23.196	1.160	1.684	0.456
			22.883	1.144	1.708	0.526

电泳图：



实验结论：

1. 从 OD 值可看出，Buffer 组与空白组（不加 DNase）的核酸产量明显高于实验组（加 DNase）。
2. 从电泳图可看出，Buffer 组与空白组（不加 DNase）有明显的 DNA 条带，实验组（加 DNase）无明显 DNA 主带，证明 DNase 活性良好。

实验步骤：

1. 取 200mg 的肝脏组织至匀浆器中，加入 2mlATL 匀浆 2-3 下，倒入离心管，加入 200ulPK 涡旋混匀后放入 55℃ 水浴锅中消化。
2. 完全消化后取出，加入 200ul RNase，涡旋混匀。
3. 然后按下表进行结合和消化

结合孔 (1/7)	200ul 消化液，30ul MagPure Particles, 600ul Buffer MPB
清洗孔 1 (2/8)	600ul Buffer MW1
DNase I (3/9)	300ul DNase Buffer, (1ul, 10ul DNase) 暂停时加入 450ul Buffer MCB 参照 1: 300ul DNase Buffer 参照 2: 加入 600ul Buffer MW1 (暂停时不补加)
清洗孔 2 (4/10)	600ul Buffer MW2
清洗孔 3 (5/11)	600ul Buffer MW2
洗脱液 (6/12)	50ul Elution Buffer 参照组用 100ul 溶解。

实验运行程序：

步骤	孔位	实验名称	等待时间	混合时间	吸磁次数	混合速度	容积	温度状态	温度
1	1	Bind	0	6	2	快	900	关	0
2	2	W1	0	2	1	快	600	关	0
3	3	消化	3	10 分钟	0	中	600	关	0
4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3	Bind	0	6	1	快	600	关	0
9	4	W1	0	1	1	快	600	关	0
10	5	W2	0	1	1	快	600	关	0
11	6	Elute	6	6	2	快	50	关	0
12	5	Remove	0	1	0	快	600	关	0

实验三：验证 DNase I 回收产物对定量 PCR 的影响

- 样品类型（模拟样品）：定量添加 DNA 病毒的猪血【样品制备方法：取 50ul 猪血+150ul 水，加入 1ul 104 乙肝病毒至样品中】
- 样品用量：200ul
- 提取方法：磁珠法
- 洗脱体积：50ul（对照组用 100ul 溶解）
- 提取时间：60 分钟
- 检测方法：Nanodrop 和 荧光定量 RT-PCR

实验数据：

Nanodrop 数据：

样品名称		加入 DNase 量 (ul)	核酸(ng/ul)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
参照	MW1	0	30.117	3.012	1.816	1.178
	DNase Buffer		29.132	2.913	1.877	1.117
实验组	1	1	6.012	0.301	1.916	0.396
			6.195	0.310	1.397	0.377
			8.937	0.447	1.654	0.517
	10	10	6.236	0.312	1.696	0.445
			5.402	0.270	1.412	0.352
			5.624	0.281	1.612	0.411

荧光定量 PCR 数据：

样品名称		DNase 量(ul)	Ct 值	扩增曲线图
参照	MW1	0	30.06	
	Dnase Buffer		30.17	
实验组	1	1	NoCt	
			NoCt	
			NoCt	
	10	10	NoCt	
			NoCt	
			NoCt	

红色线为 MW1，绿色线为 DNase Buffer，蓝色线为实验组

实验结论：

1. 从 OD 值可看出，DNase Buffer 组与 MW1 组（不加 DNase）的核酸产量明显高于实验组（加 DNase）。
2. DNase Buffer 组与 MW1 组（不加 DNase）回收得到的 DNA，进行荧光定量 PCR 时，Ct 值达到了 30，而在实验组（加 DNase）中，无扩增曲线，证明 DNA 全部被降解，该 DNase I 活性良好。

实验步骤：

1. 取 50ul 猪血+150ul 水，加入 1ul 10⁴ 乙肝病毒至样品中
2. 然后按下表进行提取：

结合孔 (1/7)	200ul 样品， 30ul MagPure Particles, 20ul PK， 500ul MLB
清洗孔 1 (2/8)	600ul Buffer MW1
DNase I (3/9)	300ul DNase Buffer, (1ul, 10ul DNase) 暂停时加入 450ul Buffer MCB 参照 1： 300ul DNase Buffer 参照 2： 加入 600ul Buffer MW1（暂停时不补加）
清洗孔 2 (4/10)	600ul Buffer MW2
清洗孔 3 (5/11)	600ul Buffer MW2
洗脱液 (6/12)	50ul Elution Buffer 参照组用 100ul 溶解。

步骤	孔位	实验名称	等待时间	混合时间	吸磁次数	混合速度	容积	温度状态	温度
1	1	Bind	0	10	2	快	900	关	0
2	2	W1	0	2	1	快	600	关	0
3	3	消化	3	20 分钟	0	中	600	关	0
4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
再加入 450ul MCB.									
5	3	Bind	0	6	1	快	600	关	0
9	4	W1	0	1	1	快	600	关	0
10	5	W2	0	1	1	快	600	关	0
11	6	Elute	6	6	2	快	50	关	0
12	5	Remove	0	1	0	快	600	关	0