

附件: (English Version: <http://www.biosky.org/sop/dna-sop-en.pdf>)

Vero 细胞 DNA 残留量 (膜杂交法) 检测 SOP

1. 目的及适用范围: 用于检测以 Vero 细胞为生产基质生产的疫苗中宿主 DNA 残留量检测。适用于 Vero 细胞培养的病毒性疫苗制品

2. 材料和仪器

2.1 DNA 探针标记和检测试剂盒 (Roche公司);

2.2 DNA 杂交膜: 阳离子尼龙膜(Roche公司);

2.3 2%蛋白酶K: 配制50mMTris-Cl (pH8.0)和1.5mM醋酸钙溶液100mL, 称取蛋白酶K 2.0g, 充分溶解, 分装后储藏于-20℃备用, 勿反复冻融;

2.4 1.0 M 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液(pH8.0):用盐酸调pH值至8.0, 高压蒸汽灭菌;

2.5 0.5M 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0):用10M NaOH调节pH至8.0, 高压蒸汽灭菌;

2.6 20%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液:用浓盐酸调pH至7.20, 高压后室温保存;

2.7 3.0M 醋酸钠溶液: 取800ml双蒸水溶解408.3g三水醋酸钠, 用冰乙酸调pH值至5.0, 定容至1L, 高压灭菌后分装备用。

2.8 10 X 蛋白酶缓冲液 (pH8.0)

1 M Tris 溶液 (pH8.0)	1.0ml
0.5M EDTANa ₂ 溶液 (pH8.0)	2.0ml
20% SDS溶液 (PH7.2)	2.5ml

加灭菌双蒸水至 10ml

2.9 TE 缓冲液 (pH8.0):量取1 M Tris 溶液(pH8.0)10ml, 0.5M 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)2ml, 加灭菌水至1000ml, 4℃保存;

2.10 Buffer I: 11.6g顺丁烯二酸, 8.76gNaCl, 固体NaOH调pH至7.5后, 定容至1L;

2.11 Buffer II: 7.88gTris-HCl, 2.93gNaCl, 5.08gMgCl₂, 1M NaOH调pH至9.5, 定容至500ml;

2.12 20X SSC: 88.2g柠檬酸钠, 175.3gNaCl, 浓盐酸调pH至7.0, 定容至1L, 高压后4℃保存;

2.13 Tris饱和分酚

2.14 本实验中所用Tip枪头及离心管均需经硅化并高压灭菌。

2.15 实验设备: 水浴箱, 蜗旋震荡仪, 电磁炉, 点样器, 真空泵, 紫外交联仪, 杂交仪

3. 实验步骤

3.1 探针标记

- 3.1.1 取适量探针标记用 Vero 细胞 DNA (2 μ g, 超声处理, 片段大小在 100-1000bp 之间), 用去离子水补足至 16 μ l, 置 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 分钟, 迅速冰浴冷却, 以每分钟 8000 转离心 5 秒;
- 3.1.2 加入试剂盒提供的随机引物 (1#) 4 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 过夜;
- 3.1.3 0.5M 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH8.0) 3 μ l 终止反应, 并加入 3M 醋酸钠溶液 2 μ l, -20 $^{\circ}$ C 预冷无水乙醇 300 μ l, -70 $^{\circ}$ C 以下作用 2 小时;
- 3.1.4 探针纯化
 - 3.1.4.1 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清, 600 μ l-20 $^{\circ}$ C 预冷 75% 乙醇洗涤沉淀 1 次;
 - 3.1.4.2 15000g 低温离心 20 分钟, 弃上清;
 - 3.1.4.3 室温吹干, 加 100 μ l TE 缓冲液溶解。

3.2 样品处理

3.2.1 蛋白酶 K 预处理

按下表对 Vero 细胞 DNA 标准品和供试品和进行加样, 混和后 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时;

样 本	加样量	2%蛋白酶K溶液	蛋白酶缓冲液	去离子水
DNA标准品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l
供试品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l

注: 样品的稀释: 选用成品标示剂量, 若规格为 1.0ml/剂的制品应分两管加样。

- 3.2.2 加入饱和酚溶液 600 μ l, 剧烈混合 15-30 秒, 15000g 离心 10 分钟;
- 3.2.3 小心移取上层液体至一干净离心管中, 加入 3M 醋酸钠溶液 60 μ l, 充分混合, 再加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷异丙醇 600 μ l; -20 $^{\circ}$ C 过夜;
- 3.2.4 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清液, 500 μ l -20 $^{\circ}$ C 75% 乙醇洗涤沉淀;
- 3.2.5 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清液, 室温通风干燥 (或 65 $^{\circ}$ C 干燥 30 分钟), 加 100 μ l TE 缓冲液溶解 (标准品采用 200 μ l TE 溶解)。

3.3 点 膜

- 3.3.1 将上述同步抽提的 DNA 标准品、供试品及探针置 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 分钟, 迅速置冰浴冷却, 以每分钟 8000 转离心 5 秒;
- 3.3.2 将 DNA 参考品用 TE 缓冲液进行 10 倍系列稀释, 使其终浓度分别为 10ng/100 μ l、1ng/100 μ l、

500pg/100 μ l、100pg/100 μ l、50pg/100 μ l 10pg/100 μ l、5pg/100 μ l、1pg/100 μ l;

3.3.3 取杂交膜浸润于 TE 缓冲液中，检查杂交膜完整性，然后组装抽滤加样器；

3.3.4 无尘环境下将 100 μ l 参考品、供试品和阳性参考品全部点样；

3.3.5 杂交膜置紫外交联仪下 5-10 分钟（根据紫外交联仪功率适当调整时间和距离）。

3.4 杂交与显色

3.4.1 取无菌培养皿，加适量已45℃预热的杂交液（7#），将杂交膜全部浸泡于其中，放于45℃、10转/min杂交仪中预杂交30分钟；

3.4.2 弃预杂交液，加入适量新鲜预热杂交液（45℃）及全部探针，45℃杂交过夜。

3.4.3 高盐洗脱：取无菌培养皿，适量 2X SSC(0.1%SDS)，将杂交膜全部浸泡于其中室温下，置水平脱色摇床，10转/min 5分钟，2次；

3.4.4 低盐洗脱：取无菌培养皿，加适量 0.5X SSC(0.1%SDS)，置45℃、10转/min杂交仪，洗脱15分钟，1次。

3.4.5 平衡：取无菌培养皿，加适量Buffer I，将杂交膜全部浸泡于其中，室温下10转/min 5分钟；

3.4.6 抗体孵育：取无菌培养皿，加适量封闭液，将杂交膜全部浸泡于其中，室温10转/min 30分钟，弃封闭液，加入新鲜封闭液，同时加入抗体（4#，1：2000），10转/min，90分钟；

3.4.7 洗脱：取无菌培养皿，加适量Buffer I（0.1%吐温20），将杂交膜全部浸泡于其中，室温10转/min 15分钟，2次；

3.4.8 平衡：取无菌培养皿，加适量Buffer II，将杂交膜全部浸泡于其中，室温下10转/min 5分钟；

3.4.9 显色：取无菌培养皿，加适量BufferII、NBT（5#，1：200），将杂交膜全部浸泡其中，室温下避光静置至显色完毕（时间不得超过4小时）；

3.4.10 终止反应：将杂交膜置TE溶液5分钟，湿膜扫描或拍照、风干并封膜。