



脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法)

说明书

版本: A/1

英文名称: Deoxyribonuclease I (DNase I) ELISA Kit

货号: 1402428 规格: 96 tests/Kit

所述产品仅供研究使用, 不得用于人或动物的诊断及治疗目的。



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！

第一章 产品信息

1. 产品描述

脱氧核糖核酸酶I (Deoxyribonuclease I, DNase I) 残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 适用于 mRNA 疫苗/药物等生物制品工艺流程中残留 DNase I 的定量检测。

本试剂盒基于固相酶联免疫吸附分析法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)，采用双抗体夹心的技术原理检测样品中 DNase I 的含量。该分析方法通过包被针对 DNase I 的抗体来捕获样品中的 DNase I，接着加入生物素标记的抗 DNase I 抗体进一步孵育结合，随后加入 HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶) 标记的链霉亲和素，孵育后洗涤；加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 底物反应，HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 生成蓝色产物 (最大吸收峰 655 nm)，随后加入终止液终止酶催化反应，生成黄色产物 (最大吸收峰 450 nm)。酶标仪采集 450 nm 波长下吸光度值，其吸光度与校准品和样品中的 DNase I 浓度成正相关。通过剂量-反应曲线可计算得出样品中 DNase I 的浓度。

本试剂盒对待测样品无需进行特殊处理，仅需通过合适的稀释比例进行适用性验证，以确定本试剂盒是否适用。本试剂盒操作步骤少，快速，检测专一性强，性能稳定可靠。

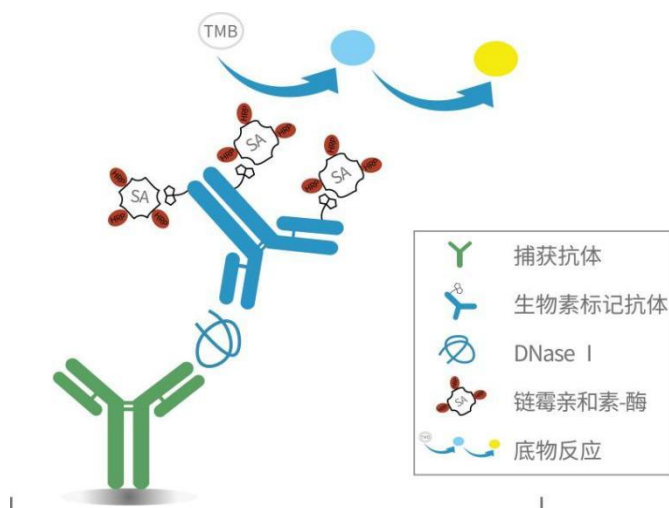


图 1 检测原理示意图

2. 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	说明
DNase I Calibration Standard (DNase I校准品)	PNB016	1 × 350 µL	液体，澄清透明，无肉眼可见不溶物。具体浓度见瓶身标注。
Anti-DNase I Microtiter Strips (抗 DNase I预包被酶标板)	PNA016	8 well × 12 strips	已包被适量的绵羊抗 DNase I多克隆抗体，铝箔袋密封包装，含干燥剂，用完及时密封保存。
Diluent (稀释液)	PNE008	2 × 25 mL	用于校准品、待测样品、检测抗体和 HRP 复合物的稀释。
Wash Buffer Concentrate (10×) (浓缩缓冲液 (10×))	PNF001	2 × 25 mL	用于洗板。使用前用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍。
Anti-DNase I: Biotinylated Conjugate (100×) (生物素偶联 DNase I抗体 (100×))	PNG008	1 × 120 µL	经生物素偶联的抗 DNase I抗体，使用前用 Diluent 稀释 100 倍，应避光并密封保存。
Streptavidin-HRP (100×) (链霉亲和素 HRP 复合物 (100×))	PNH002	1 × 140 µL	HRP 偶联的链霉亲和素，使用前用 Diluent 稀释 100 倍，应避光并密封保存。
TMB Substrate (TMB 显色液)	PND004	1 × 12 mL	使用前于室温平衡 20 分钟以上，应避光并密封保存。
Stop Solution (终止液)	PNI002	1 × 6 mL	为盐酸溶液，操作时戴好护目镜并避免接触皮肤。
Sealing Film (封板膜)	PNK001	3 pieces	用于密封覆盖酶标板条，防止污染和液体蒸发。

备注：室温指 25 °C ± 3 °C。

3. 储存条件及有效期

未开封试剂盒置 2-8 °C 保存，有效期为 12 个月，具体详见试剂盒标签。
开封组分的保存要求如下：

表 2. 开封组分有效期

名 称	效 期
Anti-DNase I Microtiter Strips (PNA016)	开封后的酶标板条连同干燥剂于自封袋中密封保存，在 2-8 °C 条件经验证可以稳定保存 90 天。

4. 实验所需设备/材料

表 3. 实验所需设备/材料

设备	酶标仪(能够检测 450 nm 和 620-650 nm 区间内单一波长的吸光度值)
	多道移液器、单道移液器
	涡旋振荡器
	微孔板恒温振荡器
	恒温箱 (25 °C±3 °C)
	洗板机 (可选)
耗材	1.5 mL 低吸附离心管 (货号: 1901100)
	低吸附滤芯枪头 (货号: 1901980-10/100/200/1000)
	加样槽
	吸水纸

5. 快速操作流程

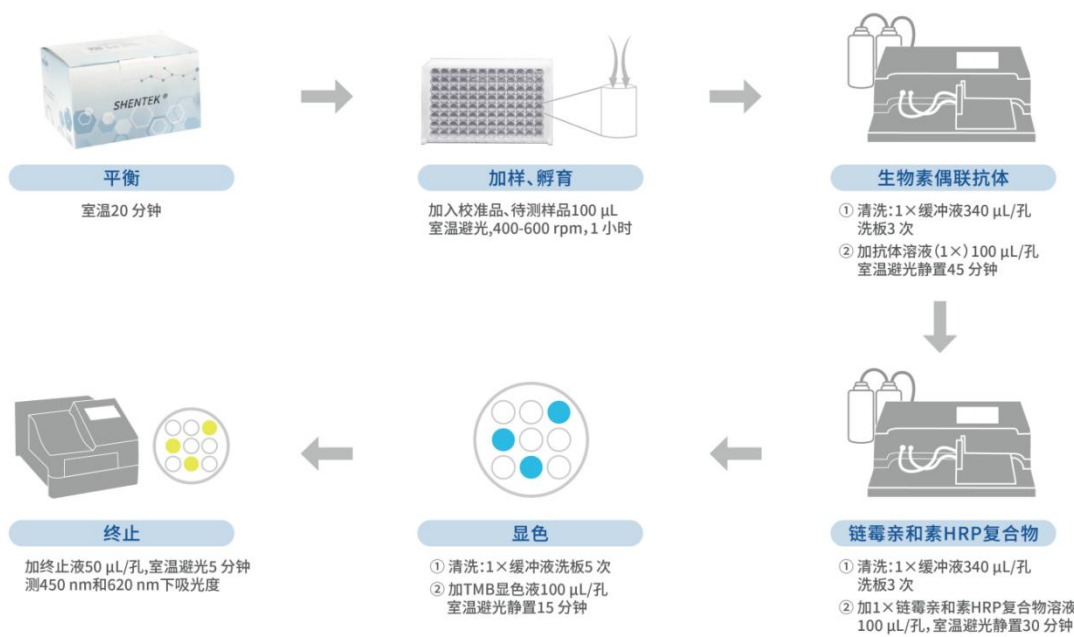


图 2 操作流程示意图

第二章 试剂盒使用

1. 试剂、仪器准备

1.1. 实验前准备

- 1) 取出试剂盒，于室温平衡约 20 分钟。其余试剂在使用前均需提前取出，于室温平衡；在使用后立即放回 2-8 °C 保存。
- 2) 根据检测样品数量计算所需孔数，取出相应数量的预包被酶标板条，剩余板条连同干燥剂置于自封袋中密封，放回试剂盒中，保存在 2-8 °C 冰箱，于效期内使用完。

1.2. 试剂配制

- 1) 1×缓冲液配制：Wash Buffer Concentrate (10×) (PNF001) 用超纯水稀释 10 倍，例如取 25 mL Wash Buffer Concentrate (10×) (PNF001) 加入超纯水 225 mL 混匀，即为 1×缓冲液，用于洗板。建议现配现用。若采用洗板机洗涤，可能发生试剂量不够，可单独采购相同产品号的缓冲液。

备注：取出 Wash Buffer Concentrate (10×) (PNF001) 和 Diluent (PNE008)，观察如有结晶属正常现象，于 37 °C 温育直至完全溶解。

- 2) 1×生物素偶联 DNase I 抗体溶液配制：用 Diluent (PNE008) 于无菌离心管中将 Anti-DNase I: Biotinylated Conjugate (100×) (PNG008) 稀释 100 倍，用涡旋振荡器振荡混匀，避免剧烈振荡，即为 1×生物素偶联 DNase I 抗体溶液。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。
- 3) 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液配制：用 Diluent (PNE008) 于无菌离心管中将 Streptavidin-HRP (100×) (PNH002) 稀释 100 倍，用涡旋振荡器振荡混匀，避免剧烈振荡，即为 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。配制后当天使用。
- 4) 校准曲线配制：参照图 3 和表 4 对校准品进行梯度稀释。

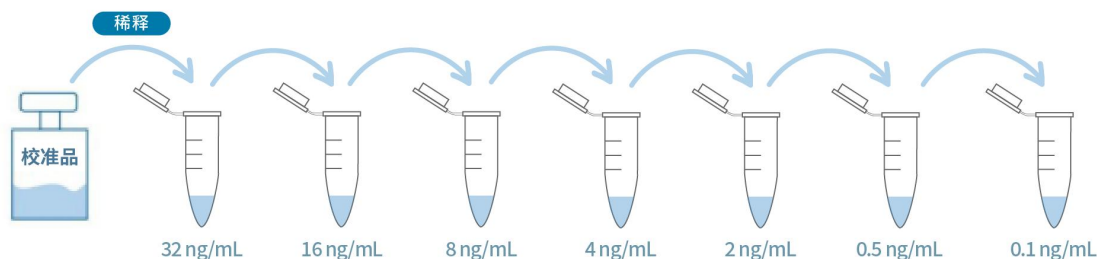


图 3 校准品稀释操作示例

表 4. 系列校准品梯度稀释

校准曲线样品	加样	浓度 (ng/mL)
ST1	校准品用 Diluent 稀释到 ST1 浓度	32
ST2	500 μ L ST1 溶液 + 500 μ L Diluent	16
ST3	500 μ L ST2 溶液 + 500 μ L Diluent	8
ST4	500 μ L ST3 溶液 + 500 μ L Diluent	4
ST5	500 μ L ST4 溶液 + 500 μ L Diluent	2
ST6	250 μ L ST5 溶液 + 750 μ L Diluent	0.5
ST7 ^[1]	200 μ L ST6 溶液 + 800 μ L Diluent	0.1
NCS (阴性对照)	Diluent	0

^[1]ST7 (0.1 ng/mL) 为锚定点参与校准曲线的拟合，但在方法学验证中对其浓度 CV 及相对偏差不做要求。

2. 样品准备

- 1) 样品：mRNA 疫苗/药物等生物制品工艺过程样品、原液和成品等。应清澈透明，经离心或过滤等方式去除不溶物。
- 2) 存放：样品务必事先有稳定性的研究，明确最佳的保存条件；一般建议样品长期储存应放置于-65 °C以下环境中，且不宜反复冻融。
- 3) 处理：待测样品根据其预估所含的 DNase I 浓度，用 Diluent (PNE008) 稀释适当倍数，使其检测值落入校准曲线定量范围之内。
- 4) 对初次使用或样品中 DNase I 含量未知的情况，强烈建议进行样品适用性验证，确定适宜的样品稀释倍数，以便更好进行后续常规检测。

备注：相关验证方案可咨询我司技术支持。

3. 操作步骤

3.1. 孵育：校准品及待测样品

- 1) 单通道移液器配合无菌滤芯吸头准确移取 100 μ L 系列校准品溶液及 Diluent (PNE008) (NCS) 加入相应微孔板条中，溶液加入孔底部，操作时避免产生气泡，每个浓度建议做 2-3 个平行复孔，并记录各浓度孔所在位置。
- 2) 将处理好的待测样品按同样操作加入相应微孔板条中。加样后将微孔板条用封板膜密封，放置于微孔板恒温振荡器上，室温条件下 400-600 rpm，避光振荡孵育 1 小时。（若没有配备微孔板恒温振荡器，可选择室温避光静置孵育 2 小时。）

表 5. 酶标板条加样排板示例

	1	2	3	4	5	6	
A	NCS	NCS	NCS				
B	ST7	ST7	ST7				ST: 校准曲线
C	ST6	ST6	ST6	S1	S1	S1	NCS: 阴性对照
D	ST5	ST5	ST5	S2	S2	S2	S: 待测样品
E	ST4	ST4	ST4	S3	S3	S3	S+SRC: 待测样品的加标回收
F	ST3	ST3	ST3	S1+SRC	S1+SRC	S1+SRC	备注: 客户可根据方法验证结果 确定日常检测复孔数及是否设置 加标回收
G	ST2	ST2	ST2	S2+SRC	S2+SRC	S2+SRC	
H	ST1	ST1	ST1	S3+SRC	S3+SRC	S3+SRC	

3.2. 生物素偶联 DNase I 抗体孵育

- 1) 倒去反应液，用 1×缓冲液洗板，340 μL/孔，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板条应立即进行后续操作，不可放置，期间避免微孔板条干燥。本步骤也可由自动洗板机完成。
- 2) 准确移取 100 μL 1×生物素偶联 DNase I 抗体溶液至上述微孔板条孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温避光静置孵育 45 分钟。

3.3. 链霉亲和素 HRP 复合物孵育

- 1) 倒去反应液，用 1×缓冲液洗板，340 μL/孔，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板条应立即进行后续操作，不可放置。本步骤也可由自动洗板机完成。
- 2) 取 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液倒入加样槽中，用多通道移液器配合无菌滤芯吸头快速将溶液 100 μL/孔加入上述微孔板孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温避光静置孵育 30 分钟。

3.4. 洗涤、显色

- 1) 提前 20 分钟将 TMB Substrate (PND004) 置于室温条件下平衡。
- 2) 将上述板子用 1×缓冲液洗板，340 μL/孔，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干如此重复洗板 5 次。洗板后的微孔板条应立即进行后续操作，不可放置。本步骤也可由自动洗板机完成。
- 3) 取合适体积的 TMB Substrate (PND004) 于加样槽中，用多通道移液器迅速吸取 100 μL/孔加入上述微孔板条中，于室温避光静置孵育 15 分钟。此步骤勿用封板膜密封。

3.5. 终止

- 1) 取合适体积的 Stop Solution (PNI002) 于加样槽中，用多通道移液器迅速吸取 50 μL/孔加入上述微孔板条中，加入顺序需同显色液加入顺序一致，加样时吸头应悬空，

避免接触微孔板条中溶液，切勿产生气泡。

- 2) 终止后的微孔板条应室温避光静置孵育 5 分钟。

3.6. 测读

- 1) 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一波长均可），测定各孔 OD 值。测定时不可覆盖封板膜或盖子。

备注：若酶标仪没有配备长波长时，可以仅设定 450 nm 波长，但是需确保微孔板条孔底干净，无指纹或刮痕。

4. 结果计算与判断

4.1. 结果计算

- 1) 各孔 OD_{450 nm} 数值需减去各自孔的长波长 OD 值。若酶标仪没有配备长波长时，可以省去此步骤。
- 2) 各校准点和样品的 OD 值分别减去阴性对照（NCS）的 OD 值后，重复孔取均值。
- 3) 以校准点浓度值和 OD 值进行四参数拟合，获得校准曲线方程。将样品的平均 OD 值带入方程计算得到样品浓度，该浓度需乘以稀释倍数得到样品的实际浓度。
- 4) 标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件。如无，则建议采用专业的标曲制作软件，如 Curve Expert，ELISA Calc 等。

4.2. 结果判断

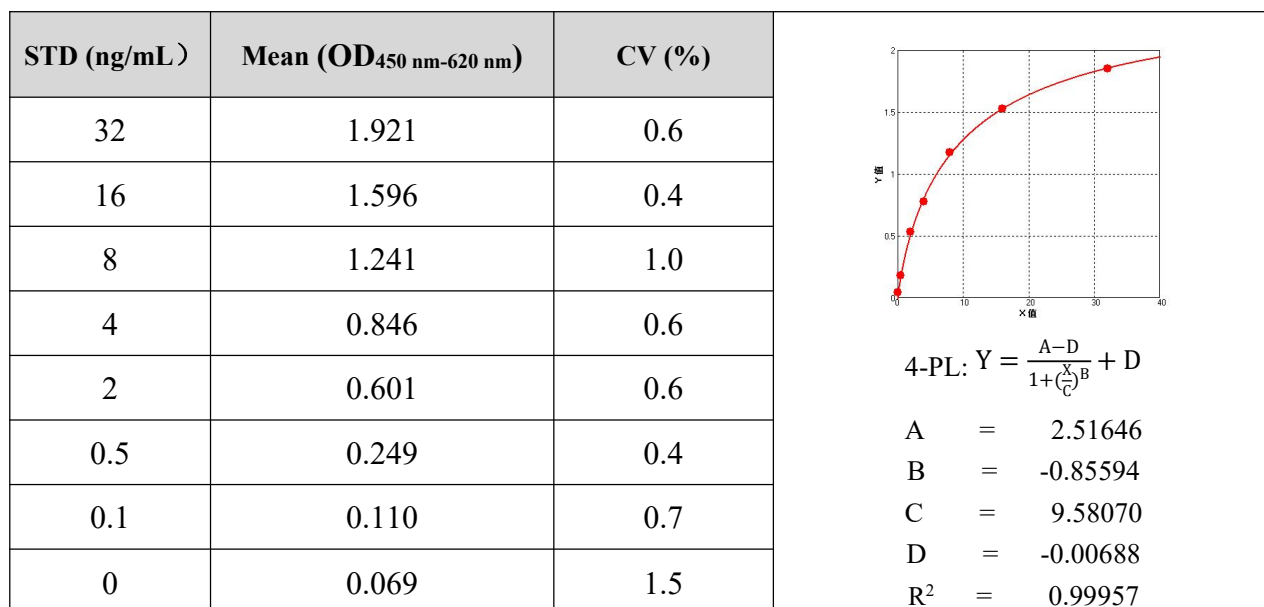
- 1) 对于吸光度值超出校准品 ST1 的样品，可用 Diluent（PNE008）稀释适宜倍数后再测定，样品中 DNase I 浓度值为稀释后测定值×稀释倍数。该稀释度下设置的适宜加标样品，回收率符合相应法规的方法学验证要求。

4.3. 检测方法的局限性

样品 pH 应保证在 6.5-8.0 之间，过低或过高的 pH 可能会造成测量值异常。

4.4. 性能参数

- 1) 线性范围：0.5-32 ng/mL，线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$ 。
- 2) QL：0.5 ng/mL。
- 3) 专属性：与 mRNA 生产工艺中其它工具酶：T7 RNA Polymerase、RNase Inhibitor、BsaI 均无交叉反应。与 *P. pastoris*、MDCK、Vero、HEK293、Sf9、CHO、*E. coli* 等宿主细胞蛋白均无交叉反应。
- 4) 典型校准曲线及其数据如下：



5. 重要事项提醒

试剂盒使用人员需经过培训，合格后方可使用。若实验结果出现异常，请及时对未使用的酶标板和试剂进行妥善保管，对显色的酶标板实验结果拍照，保留实验原始数据。联系我司技术支持为您解决问题。

为了获得满意的检测结果，请您务必事先留意如下几点事项：

- ✧ 所有的试剂配制务必使用无菌一次性的吸头、试管和加样槽等，切勿混用。避免微量移液器吸头连接部分的污染，建议每次实验前后用 75 %酒精擦拭。规范移液操作，严禁液体倒吸到移液器，或未去掉吸头时横放在桌上。
- ✧ 校准品和样品的稀释混匀要轻柔充分，勿产生大量泡沫。
- ✧ **终止液为酸性溶液，在使用中注意眼睛、面部、手和衣服的防护。**
- ✧ 不同批次试剂盒不建议混用。
- ✧ 所有生物样本均具有潜在安全风险，请使用者妥善处理。同时在实验操作时佩戴合适的个人防护用品。
- ✧ 配制缓冲液所用水需为无菌水或新鲜制备的超纯水，水温不得超过 37 °C。
- ✧ 加样时将样品加于酶标板底部，尽量不接触孔壁。注意不要有气泡，可轻轻晃动混匀。在上机检测前若有气泡存在，需用干净的 10 μ L 吸头或针头等戳破，注意不要吸走孔内液体，导致结果误差大。
- ✧ 在孵育反应时需给酶标板覆膜，防止样品蒸发。
- ✧ 倒去缓冲液后应马上加后续溶液，勿让酶标孔处于干燥状态，以防影响试剂盒检测性能。
- ✧ 未使用的酶标板条需用试剂盒附带的铝箔袋避光保存，以免被其他样品污染，导致试剂盒报废。
- ✧ 校准品配制、样品稀释等务必精确，配制时最小的取样量不要小于 5 μ L，防止结果出现较大的误差。
- ✧ 校准品、酶标抗体等请在使用前快速离心，将管盖中残留的试剂甩到管底，防止试剂的污染和损失。
- ✧ 已稀释的校准品、酶标抗体等因无法保证其稳定性，不建议再次重复使用。
- ✧ 显色液应是无色透明液体。吸取时务必更换干净的吸头，防止 HRP 污染。如发现已有淡蓝色，请弃用。
- ✧ 加入终止液终止反应后，须在 30 分钟内完成吸光度测定，以免因信号不稳定影响最终结果。
- ✧ 由于叠氮钠能抑制 HRP 活性，对检测结果有很大影响，因此样品中不能添加叠氮钠。

第三章 参考文献

1. ICH M10: 生物分析方法验证及样品分析

修订日期：2026 年 09 月 01 日

生效日期：2026 年 09 月 07 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

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：400-878-2189