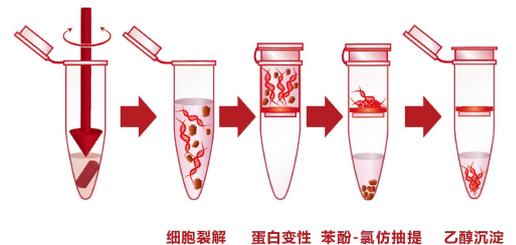


PCR 模板的制备

PCR 模板制备是 PCR 实验的首要步骤，模板制备是从待分析样本中纯化和浓缩核酸（DNA 或 RNA）以作为 PCR 扩增模板的过程。由于 PCR 用途多样，用于提取核酸的材料可能是全血、动植物组织、培养细胞、口腔涂片、体液、甚至是 1700 万年前到 2000 万年前的木兰叶化石。对于不同类型的样本，需要利用不同的方法进行核酸提取。下面分别就 PCR 模板制备的步骤及不同材料的模板制备方法做一介绍

模板制备步骤

PCR 模板制备指的是从样本中提取核酸的过程，涉及到裂解细胞、蛋白变性、酚-氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤，下面分别就这些步骤做一介绍。



裂解细胞

裂解细胞的方法有以下几种：

- 物理破壁法：超声波处理、研磨法、玻璃珠法等，适用于带细胞壁细胞的裂解，破碎时需液氮冷冻处理增加细胞壁脆性，细胞破碎后需快速加入 TE 缓冲液并迅速混匀，对细胞溶浆中 DNA 进行保护。
(TE 缓冲液成分：10mmol Tris-HCL，1mM EDTA PH8.0，Tris-HCL 的作用为提供一个缓冲环境，防止核酸 被破坏、EDTA 的作用为螯合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 离子，抑制 DNase 活性；)
- 化学试剂：SDS、TRIzol（主要用于提取 RNA）等。SDS 可以促使细胞壁破裂，同时破坏细胞膜结构；TRIzol 主要成分是苯酚和异硫氰酸胍，能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶。
- 酶解法：溶酶菌、蛋白酶 K、蜗牛酶等。蛋白酶 K 适用所有标本的消化处理，蜗牛酶常用于酶解真菌，溶酶菌可以对细菌进行裂解。
- 煮沸法：通过煮沸进行细胞的裂解，适用于质粒 DNA 的提取。
- 微波法：通过微波加热使细胞裂解，可以用于真菌基因组 DNA 的提取。

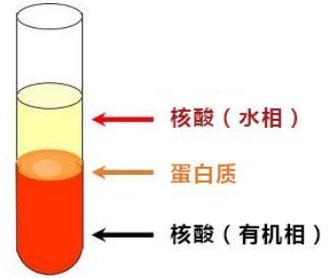
蛋白变性

蛋白变性的目的为使核酸与蛋白质之间的结合键断裂，便于后续去除蛋白质。可以利用 SDS 等去污剂使蛋白变性，也可利用煮沸的方法使蛋白变性。另外，在苯酚-氯仿抽提的步骤中，苯酚也可以使蛋白变性。

苯酚-氯仿抽提

苯酚-氯仿抽提的目的为去除细胞裂解液中蛋白、多糖、酚类等杂质，分离核酸。使用苯酚-氯仿溶液处理裂解后的匀浆液，最终核酸分子溶于上层的水相，多糖、酚类等处于下层的有机相，蛋白质则沉淀于两相之间。

在苯酚-氯仿溶液中苯酚的作用是使蛋白变性，同时抑制 DNase 的降解作用；氯仿是分子量比较大的有机溶剂，使用氯仿作为有机相可以达到快速的和无机相分离的效果。在用苯酚-氯仿抽提核酸时，通常要加入少许异戊醇（苯酚：氯仿：异戊醇



=25:24:1)，异戊醇可以减少蛋白质变性操作过程中产生的气泡，另外，异戊醇有助于分相，使离心后的上层含 DNA 的水相、中间变性蛋白相及下层有机相溶剂维持稳定。

乙醇沉淀

核酸具有不溶于无水乙醇（准确的说是浓度为 66% 以上的乙醇）的特性。苯酚-氯仿抽提后取上层水相，加入无水乙醇，轻轻混匀后即出现丝状的沉淀。离心，弃去上清，沉淀即为核酸。最后利用 TE 缓冲液重新溶解核酸，即可作为 PCR 的模板。

说明：由于 PCR 实验对于模板纯度要求并不高，因此不需去除杂质，同样可以 PCR 的模板。例如对于单细胞的微生物、血细胞或培养的细胞利用 SDS 破坏细胞的膜结构使 DNA 释放出来后，即可直接作为模板。对于较复杂的动植物组织则添加蛋白酶 K 进行适当消化，即可达到同样的目的。

常见的 DNA 模板制备方法

常见的 DNA 模板制备方法有 CTAB 法、SDS 法、蜗牛酶法、蛋白酶 K 消化裂解法、碱裂解法、煮沸法、微波法等。不同的方法适合处理的样本种类也有所不同，下面分别就这些方法做一介绍：

CTAB 法

CTAB 法通常用于植物 DNA 的提取。CTAB 是一种阳离子去污剂，可溶解细胞膜并与核酸形成复合物，该复合物在高盐溶液中（0.7mol/L NaCl）是可溶的，当降低溶液的浓度到一定程度（0.3mol/L NaCl）时从溶液中沉淀。

研磨破碎细胞后加入 65°C 预热的 CTAB，通过离心就可以将 CTAB 与核酸的复合物同蛋白、多糖类物质分开，然后将 CTAB 与核酸的复合物沉淀溶解于高盐溶液中，加入乙醇使核酸沉淀（CTAB 能溶解于乙醇中，不会沉淀），最终收集得到核酸。

蜗牛酶法

蜗牛酶法常用于真菌基因组 DNA 的提取。其原理为利用蜗牛酶裂解细胞，随后经蛋白变性、酚-氯仿抽提、乙醇沉

淀等步骤即可得到基因组 DNA。

微波法

微波法可以用于真菌基因组 DNA 的提取。其原理为利用微波加热破碎真菌，并使蛋白变性，随后经苯酚-氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤即可得到基因组 DNA。

蛋白酶 K 消化裂解法

蛋白酶 K 消化裂解法适用于所有标本的消化处理。蛋白酶 K 消化液的配方为：

10mmol/L Tris-HCL (PH8.0) ， 10mmol/L EDTA ， 150mmol/L NaCL ， 0.5% SDS ， 100~200ug/ml 蛋白酶 K (蛋白酶 K 最好用水配成 20mg/ml ， 临用时加入消化液中)

在样本中加入蛋白酶 K 消化液，待细胞裂解后，经苯酚-氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤即可得到模板 DNA。

碱裂解法

碱裂解法通常用于从细胞中提取质粒 DNA 质粒。其原理为将细胞置于强碱性 (NaOH) 环境，强碱环境使细胞裂解，同时使细胞裂解释放出来的 DNA 变性，随后用酸性溶液中和使溶液处于中性，质粒 DNA 将迅速复性，而基因组 DNA 由于分子巨大难以复性。离心后，质粒 DNA 在上清中，而基因组 DNA 则与细胞碎片一起沉淀到离心管的底部。通过这种方法即可将质粒 DNA 从细胞中提取出来。

煮沸法

煮沸法通常用于从细胞中提取质粒 DNA。其原理是将细胞悬浮在含有能消化细胞壁的溶菌酶的缓冲液中，然后加热到 100℃使细胞裂解，同时使 DNA 解链、使蛋白质变性。闭环质粒变性后 DNA 链彼此不会分离，当温度下降后又会重新形成超螺旋分子。染色体 DNA 不会复性，离心除去变性的染色体 DNA 和蛋白质，就可以从上清中回收质粒 DNA。

RNA 模板制备

RNA 模板制备通常用 TRIzol 法，其原理为利用 TRIzol 试剂裂解细胞，随后经苯酚-氯仿抽提、异戊醇沉淀等步骤即可得到 RNA 模板。

由于环境中大量的 RNA 酶，在 RNA 操作的过程中要时刻注意避免 RNA 的降解，如确保操作环境干净无污染，操作时带好口罩、手套，实验所涉及的器材、材料要经彻底处理，确保无 RNA 酶等，同时需快速操作缩短实验时间以避免 RNA 的降解。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

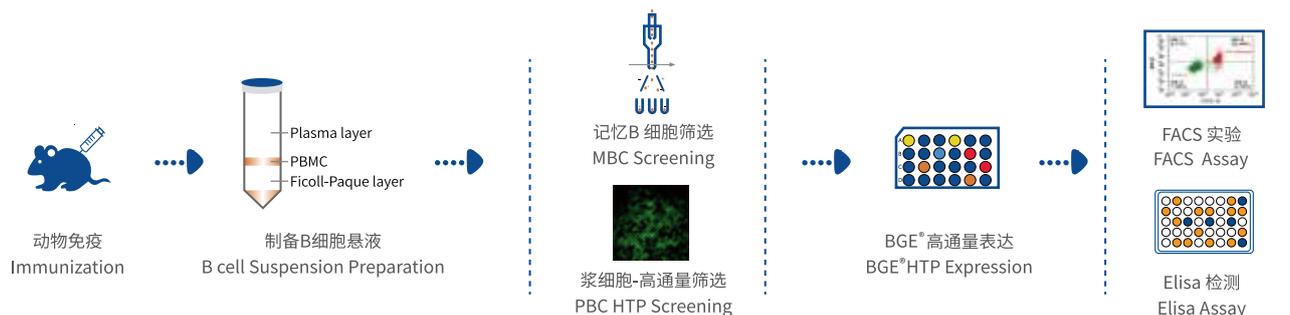
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

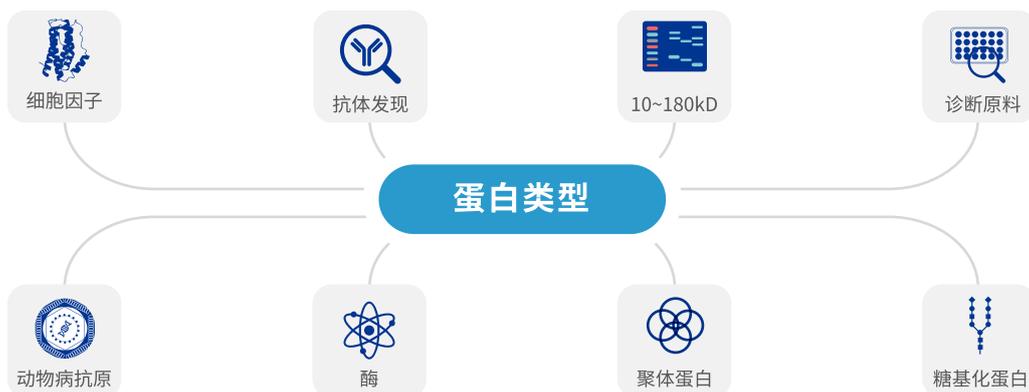


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

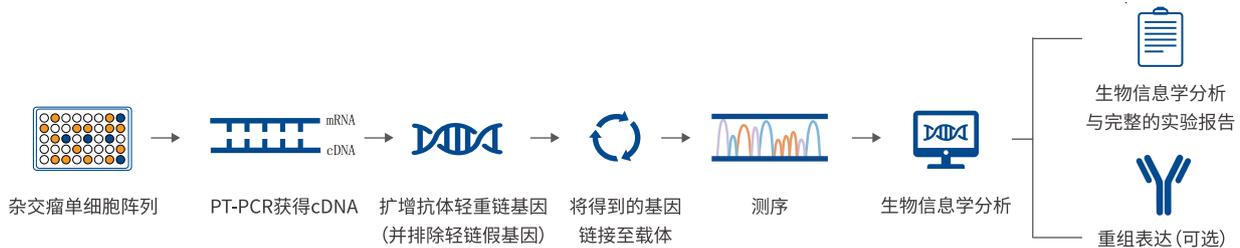
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



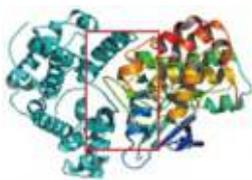
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

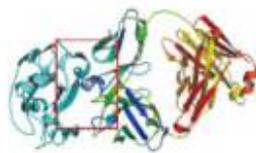
检测范围



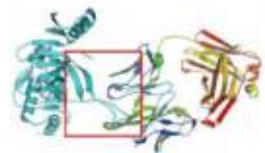
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



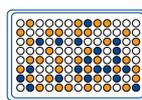
基因合成&质粒抽提



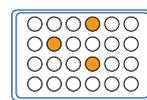
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L