

RNase Viability Assay Kit (Fluorescent Labeling)

RNase 活性检测试剂盒（荧光标记法）

产品简介

RNase 活性检测试剂盒（荧光标记法）使用一种新型 RNA 底物，其一端标记有荧光报告基团分子(Fluor)，另一端标记有淬灭基团。在不存在 RNase 时，淬灭基团的物理接近会将荧光报告基团中的荧光淬灭到极低水平。当有 RNase 时，RNA 底物被水解，荧光报告基团和淬灭基团在溶液中的空间上发生分离，这导致 Fluor 在被适当波长的光激发时发出明亮的荧光，该荧光可以通过多功能酶标仪（含荧光模块）和基于滤光片或单色器的荧光计进行检测。

RNase 活性检测试剂盒（荧光标记法）采用底物荧光标记法，可定量或定性的检测单个样品中的 RNase，从而判断样本是否有 RNase 污染。

产品信息

货号	41309ES96 / 41309ES97
规格	1×96 T / 5×96 T

组分信息

组分编号	组分名称	41309ES96	41309ES97
41309-A	RNase Substrate	1 tube	5×1 tube
41309-B	10×RNase buffer	1 mL	5 mL
41309-C	RNase A ($\approx 1 \times 10^{-4}$ U/ μ L)	100 μ L	500 μ L
41309-D	DEPC-treated Water	10 mL	50 mL
41309-E	Surface RNase Remover	50 mL	250 mL

运输和储存条件

1. 所有组分均干冰运输，有效期 1 年。
2. 收到货后，请先检查共 5 个组分是否齐全，再将 41309-E 组分 2-8°C 保存，其它组分-25~-15°C 保存，避免反复冻融。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。
5. 加样和配液步骤请严格在**冰上操作**，以减缓上机前酶对底物的消耗。
6. 实验需使用**低吸附耗材**以降低酶损耗。
7. 定量实验需使用**黑色酶标板**以最大程度减少本底荧光。

使用说明

1. 适用机型

包含但不限于以下仪器：

Thermo Scientific: Invitrogen Qubit 4;

Molecular Devices: SpectraMax M3.

2. 实验前准备

- 1) 在整个实验开始前，请先使用试剂盒中的 Surface RNase Remover 对实验环境进行处理（可稀释 10 倍进行喷洒或擦拭，具体可参考翌圣 10609ES60 使用说明书），以降低 RNase 污染。
- 2) 本品可对具备活性的 RNase 进行检测及估值，在实验过程中可根据实际情况选择定性检测或者定量检测方法。

3. 定性检测方法

使用终点法在荧光仪或酶标仪上对待测样本进行读数，以 Thermo 公司 Invitrogen Qubit 4 荧光仪为例：

- 1) 溶解 RNase Substrate：取 1 管 RNase Substrate 干粉，高速离心，缓慢打开瓶盖加入 1 mL DEPC-treated Water 备用。
- 2) 配制反应体系：每次实验均需制备阴性对照、阳性对照和待测样本体系。具体操作如下（按顺序加入下列试剂并混匀）：

阴性对照反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	160
10×RNase buffer	20
RNase Substrate	20
总体积	200

表 1 阴性对照反应体系

阳性对照反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	140
10×RNase buffer	20
RNase Substrate	20
5 pg/μL RNase A [*]	20
总体积	200

表 2 阳性对照反应体系

*试剂盒 C 组分的 RNase A 参考品稀释 20 倍约为 5 pg/μL 的 RNase A。

待测样本反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	140
10×RNase buffer	20
RNase Substrate	20
待测样本	20
总体积	200

表 3 待测样本反应体系

*若待测样本污染较轻可增加待测样本体积，最大可增加至 160 μL，相应减少 DEPC-treated Water 添加量，最小可减少至 0，保持总体积不变。

- 3) 检测初始荧光值：以 Qubit4 为例，对阴性对照、阳性对照和待测样本进行检测，选择“Fluorometer”进入荧光检测界面后，再选择“Blue”进行检测，并记录初始荧光值“RFU₀”。
- 4) 37°C 孵育读数：将阴性对照、阳性对照和待测样本均放入 37°C 恒温箱孵育 60 min 后，重复步骤 3，记录终末荧光值“RFU₆₀”。
- 5) 结果判读：若阴性对照荧光值孵育前后变化不超过 50%，阳性对照 RFU₆₀ 远大于 2RFU₀，且待测样本 RFU₆₀ ≥ 2RFU₀，则判定待测样本被 RNase 污染。

4. 定量检测方法

使用多功能酶标仪对 RNase 进行实时监测并定量,使用此方法可以获得 RNase 消化底物的实时曲线。以 Molecular Devices 公司 SpectraMax M3 多功能酶标仪为例:

- 1) 溶解 RNase Substrate^{*}: 取 1 管 RNase Substrate 干粉, 高速离心, 缓慢打开瓶盖加入 1 mL DEPC-treated Water 备用, 该干粉加入 DEPC 水后, 可分装置于-25~-15°C短期保存(不超过 3 个月), 使用时避免反复冻融。
- 2) 稀释 RNase A^{**}: 对试剂盒中 RNase A 梯度稀释, 浓度依次为 5 pg/μL、2.5 pg/μL、1 pg/μL、0.1 pg/μL。操作如下:
 - a. 取 1.5 mL 洁净离心管, 加入 495 μL DEPC-treated Water, 再加入 5 μL 10×RNase buffer, 即获得 500 μL 0.1×RNase buffer, 用于后续配置梯度稀释液, 配置前请将溶液轻微振荡混匀。
 - b. 取 5 支洁净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4。
 - c. 在标记为 Std0^{***}的 1.5 mL 离心管中加入 45 μL 0.1×RNase buffer 和 5 μL 试剂盒中提供的 RNase A($\approx 1 \times 10^{-4}$ U/μL), 即稀释为 10 pg/μL ($\approx 1 \times 10^{-5}$ U/μL) 的 RNase A。
 - d. 在 Std1、Std2、Std3、Std4 管中先分别加入下表所示体积的 0.1×RNase buffer, 再进行梯度稀释, 具体稀释方法如下:

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	30μL Std0 + 30μL 0.1×RNase buffer	5 pg/μL
Std2	30μL Std1 + 30μL 0.1×RNase buffer	2.5 pg/μL
Std3	20μL Std2 + 30μL 0.1×RNase buffer	1 pg/μL
Std4	5μL Std3 + 45μL 0.1×RNase buffer	0.1 pg/μL

表 4 标准品梯度稀释

^{*}为减少反复冻融次数和避免污染, 建议初次使用时将稀释好的 RNase Substrate 分装储存于-25~-15°C。

^{**}已知试剂盒中的 RNase A 浓度为 $\approx 1 \times 10^{-4}$ U/μL, 且对于 RNase A 的单位 U 和 pg 的换算关系为 5×10^{-7} U \approx 0.5pg。

^{***}Std0 配制: 将试剂盒中 RNase A 由 1×10^{-4} U/μL 稀释至 1×10^{-5} U/μL, 因 5×10^{-7} U \approx 0.5pg, 则 1×10^{-5} U \approx 10pg, 故 1×10^{-5} U/μL \approx 10pg/μL。

3) 标准品和待测样本的反应体系配制:

- a. 标准品和阴性对照的 Mix 混合液配制: 通常包括 4 个浓度梯度的 RNase A 参考品标准曲线和 1 个无模板对照 NTC 共 5 个样本, 每个样本 2 个重复孔, 再加 1 孔的损失量, 共计 11 个孔。具体操作如下(按顺序加入下列试剂并混匀):

Mix 混合液	体积(μL)
DEPC-treated Water	770 (11*70)
10×RNase buffer	110 (11*10)
RNase Substrate	110 (11*10)
总体积	990 (11*90)

表 5 Mix 混合液配制体系

标准品和阴性对照反应体系配制: 将上述配制的 Mix 混合液以 90 μL/孔进行分装, 再添加 10 μL/孔稀释好的 RNase A 参考品或 10 μL/孔的阴性对照(可用 0.1×RNase buffer 作为阴性对照)。具体操作如下:

标准品反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	70
10×RNase buffer	10
RNase Substrate	10
RNase A 参考品梯度稀释液	10
总体积	100

表 6 标准品反应体系

阴性对照反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	70
10×RNase buffer	10
RNase Substrate	10
0.1×RNase buffer	10
总体积	100

表 7 阴性对照反应体系

b. 待测样本反应体系配制（按顺序加入下列试剂并混匀）：

待测样本反应体系	体积(μL)
DEPC-treated Water	70
10×RNase buffer	10
RNase Substrate	10
待测样本*	10
总体积	100

表 8 待测样本反应体系

*若待测样本污染较轻可增加待测样本体积，最大可增加至 80 μL（待测样本的本底检测与之保持一致），相应的减少 DEPC-treated Water 添加量，最小可减少至 0，保持反应体系总体积不变。

c. 待测样本的本底检测反应体系配制：

待测样本的本底反应体系*	体积(μL)
DEPC-treated Water	90
待测样本**	10
总体积***	100

表 9 待测样本的本底反应体系

*建议每次进行 RNase 活性检测时，针对每个初次测试的待测样本都增加不含 RNase Substrate 的本底荧光检测，若本底荧光偏高则计算时应减去。

**每次进行 RNase 活性检测实验时，标准品、阴性对照、待测样本、待测样本的本底检测等都至少做 2 个重复孔。

***为确保检测的准确性，所有样本进行加样时，请务必在冰上操作。

4) 下表为参考板位：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1		待测样本 TS1	待测样本 TS1	TS1 本底检测	TS1 本底检测					
B	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2		待测样本 TS2	待测样本 TS2	TS2 本底检测	TS2 本底检测					
C	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3		待测样本 TS3	待测样本 TS3	TS3 本底检测	TS3 本底检测					
D	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4		待测样本 TS4	待测样本 TS4	TS4 本底检测	TS4 本底检测					
E				待测样本 TS5	待测样本 TS5	TS5 本底检测	TS5 本底检测					
F				待测样本 TS6	待测样本 TS6	TS6 本底检测	TS6 本底检测					
G				待测样本 TS7	待测样本 TS7	TS7 本底检测	TS7 本底检测					
H	NTC	NTC		待测样本 TS8	待测样本 TS8	TS8 本底检测	TS8 本底检测					

表 10 上机参考板位

该示例是对 RNase 活性检测的荧光标记法的操作展示，检测样本包括：4 个浓度梯度的 RNase A 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、8 个待测样本 TS、8 个待测样本对应的本底检测。建议每个样本做 2 个重复孔。

5) 仪器设置：使用酶标仪进行本实验，选择 96 孔板动力学模式以及荧光检测模块，选择中等增益，设置激发光 490 nm，发射光 520 nm；以 1 min 间隔读取数据，37°C 恒温连续读数 1 h（视待测物污染情况而定），此方法可实时监控体系动态。

6) 结果判读：

- 若 $RFU_{60} \geq 2RFU_0$ ，则判定待测样本被 RNase 污染。
- 若判定样本已污染，则制作标准曲线检测待测样本 RNase 污染含量（以下示例显示总体系的污染含量，如：标准品 5 pg/ μ L，加样量 10 μ L，即总体系含量 50 pg）：
- 以标准品开始读数时的前几分钟（可从时间曲线上判断线性增长期并选择合适的时间点，如下图一般选择 0-3 min）所得数据制作标准曲线，再结合标准曲线和待测样本在此时间点的荧光值可得其 RNase 污染的估值，也可通过实时荧光曲线趋势判断待测样本中 RNase 的污染情况。

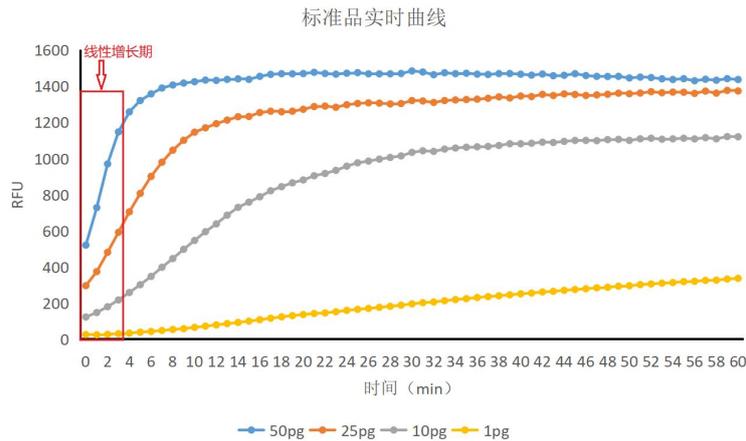
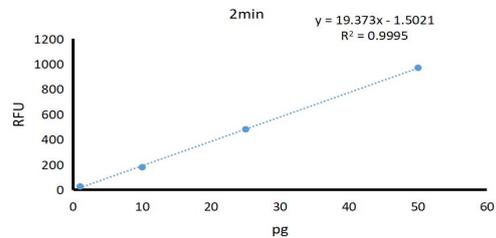


图 1 RNase 活性检测试剂盒动力曲线

d. 示例：已知待测样本的 $RFU_{60} \geq 2RFU_0$ ，选择 2 min 时标准品各稀释梯度对应的 RFU 制作标准曲线（如下图），将待测样本 2 min 时的 RFU 值代入标曲公式，即得待测样本整体的 RNase 活性浓度。

Standard (pg)	RFU (2min)
50	969.955
25	481.476
10	180.596
1	28.058



图表 2 2min 时的标准曲线

【注】：

- 该试剂盒测定的是待测样本体系整体的 RNase 活性残留。
- 试剂盒利用 RNase 对底物特异性切割的特性进行检测，因此具有使蛋白质变性及含有使 RNA 单链断裂的物质不适用此试剂盒。
- 深色液体会对荧光收集产生影响，可能会影响结果准确性。
- 部分待测样本由于过酸、过碱或盐离子浓度过高抑制 RNase 的活性，可视情况对待测样本进行稀释后检测。
- 在使用定量方法检测时，仪器有时初始荧光值会虚高，请观察时间曲线选择最低荧光值作为 RFU_0 进行污染判断。