

DNase Viability Assay Kit (Fluorescent Labeling)

DNase 活性检测试剂盒（荧光标记法）

产品简介

DNase 活性检测试剂盒（荧光标记法）使用一种新型 DNA 底物，其一端标记有荧光报告基团分子，另一端标记有淬灭基团。在不存在 DNase 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 DNase 时，DNA 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，这导致荧光报告基团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）和荧光定量 PCR 仪进行检测。

DNase 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 DNase，从而判断样本是否有 DNase 污染。

产品信息

货号	41322ES48 / 41322ES68
规格	48 T / 192 T

组分信息

组分编号	组分名称	41322ES48	41322ES68
Part I	41322-A	DNase Substrate	1 vial
	41322-B	Dilution buffer 1	0.5 mL
	41322-C	10× Reaction buffer	0.5 mL
	41322-D	DNase I (2U/μL)	10 μL
	41322-E	Dilution buffer 2	6 mL
	41322-F	DNase&RNase free water	25 mL
Part II	41322-G	Surface DNase Remover	50 mL

储存条件

Part I，-25~-15℃保存；Part II，常温保存*。有效期 1 年**；

*Part I，-25~-15℃运输；Part II，常温运输。收到货后，请检查各组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

**试剂盒未拆封有效期 1 年，拆封后有效期 6 个月，建议将 A 组分溶液按照每次使用量进行分装避免反复冻融影响质量。

使用说明

1. 实验前准备

1) 本试剂盒未提供但实验所需的实验材料：

- 无 DNase 无 RNase 移液器与吸头
- 无 DNase 无 RNase EP 管
- 无 DNase 无 RNase 黑色不透明底 96 孔板

2) 本试剂盒未提供但实验所需的实验设备和仪器：

a. 多功能酶标仪（含荧光模块，含 ex/em=485/525nm 波长，且具有荧光增益值调节功能）或者荧光定量 PCR 仪。

3) 实验环境准备

为避免外源 DNase 污染，实验开始前，先使用试剂盒中的 Surface DNase Remover（41322-G）对实验环境进行处理，可喷洒于实验台面、手套等表面，5 分钟后用洁净纸巾擦拭干净即可进行后续的实验操作。

4) 试剂配制

所有试剂在实验前，请先平衡至室温（18~25℃），充分振荡混匀后，瞬时离心（4000~7000rpm 离心 10 秒）。

a. **DNase Substrate Stock solution:** 将 A 组分平衡至室温后，4000~7000rpm 离心 60s，小心打开盖子后加入 40μL B 组分制备成 DNase Substrate Stock solution，然后根据每次实验用量将母液进行分装，-25~-15℃储存，避免反复冻融。

b. **DNase Substrate Work solution:** 实验开始前，取出 DNase Substrate Stock solution 恢复至室温后进行 50 倍稀释，现配现用，注意避光。举例：向 10μL DNase Substrate Stock solution 中加入 490μL B 组分，轻微震荡混匀后离心。

5) 首次使用时的增益值调节

因实验室所用酶标仪不同，首次测试前需调节合适的增益值，以避免灵敏度下降或信号过饱和的风险。

a. 加样：

实验前注意事项：1. 加样操作应尽量快，时间过长会影响实验准确性；2. 所有试剂使用前应充分混匀，加样时应将样品加入酶标板孔中底部，避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡。

使用无 DNase 无 RNase 黑色不透明底 96 孔板，选择 2 个孔，每孔加入 10μL DNase Substrate Work solution 和 10μL C 组分；随后向 2 个孔中的其中 1 个孔内加入 80μL F 组分（**阴性对照，NC**），另外 1 个孔内加入 79μL F 组分+1μL D 组分（**阳性对照 1，PC1**）。

组分编号	组分名称	体积（总体积 100 μL）	
		NC	PC1
/	DNase Substrate Work solution	10 μL	10 μL
C	10× Reaction buffer	10 μL	10 μL
F	DNase&RNase free water	80 μL	79 μL
D	DNase I (2U/μL)	/	1 μL

表 1：增益值调节体系配制

b. 孵育：

在 37℃条件下避光放置 30min 后测试。

c. 仪器参数设置：

温度 37℃，终点模式，检测前振板 10~15s，激发波长λEx = 485 nm，发射波长λEm = 525 nm。

d. 增益值调节：

如果酶标仪有自动增益选项，则选用自动增益。如果酶标仪没有自动增益选项，则根据增益值范围先设置中间值，然后根据反应后**阳性对照 1 (PC1)** 的荧光值来调节合适的增益值：如超过仪器上限，则适当降低增益值，如远低于仪器上限，则适当调高增益值。

*不同荧光酶标仪的参数不一样，首次测试前需调节合适的增益值，若酶标仪不具备设置增益值的功能，可选用荧光定量 PCR 仪(含 FAM 通道)配套无 DNase 无 RNase 的 qPCR 八联管或 qPCR 96 孔板使用。荧光定量 PCR 仪参数设置为 FAM 通道，反应程序 37℃，1min (读取荧光)，30 个循环，反应体积 100μL。使用原始荧光曲线数据进行计算，第 1 个循环作为 RFU₀，第 30 个循环作为 RFU₃₀。

2. 实验方法

本品可对样品中具有活性的 DNase 进行定性检测或者定量检测，用户可根据实际情况和实验目的选择使用其中一种检测方

法。本说明书中列举了 2 种检测方法的具体操作内容。

实验前注意事项：1. 加样操作应尽量快，时间过长会影响实验准确性；2. 所有试剂使用前应充分摇匀，加样时应将所加样品加入酶标板孔中底部，避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡。

1) 定性检测：

a. 样品和反应体系制备：实验共设置 3 种样品进行检测，包括 1 个阴性对照（NC），1 个阳性对照 2（PC2）和待测样品（UnK）。先根据总样品数量计算需要制备的反应溶液体积（20 μ L/孔）：

组分编号	组分名称	反应溶液体积		
		1 个孔	10 个孔	N 个孔
/	DNase Substrate Work solution	10 μ L	110 μ L	10 \times (N+1) μ L
C	10 \times Reaction buffer	10 μ L	110 μ L	10 \times (N+1) μ L

表 2：反应溶液体系配制（定性实验）

再根据样品数量把制备好的反应溶液分装到各孔中，20 μ L/孔。随后向各孔中加入对应样品：

组分编号	样品名称	体积		
		NC	PC2	UnK
F	DNase&RNase free water	80 μ L	/	/
/	DNase I (2 \times 10 ⁻⁵ U/ μ L) *	/	80 μ L	/
/	待测样品 (UnK) **	/	/	80 μ L

表 3：样品添加（定性实验）

*DNase I (2 \times 10⁻⁵U/ μ L)：用 Dilution Buffer 2 (E 组分) 将 DNase I (2U/ μ L) 稀释 10⁵倍，每步稀释倍数不要大于 100 倍，从而得到 2 \times 10⁻⁵U/ μ L DNase I：

管号	Dilution Buffer 2 的体积 (μ L)	加入的标准品体积 (μ L)	终浓度 (U/ μ L)
A	198 μ L	2 μ L DNase I (2U/ μ L)	2 \times 10 ⁻² U/ μ L
B	198 μ L	2 μ L A	2 \times 10 ⁻⁴ U/ μ L
C	180 μ L	20 μ L B	2 \times 10 ⁻⁵ U/ μ L

表 4：DNase I (2 \times 10⁻⁵U/ μ L) 配制

**待测样品 (UnK)：需要根据实际待测样本的情况，考虑是否需要用 DNase&RNase free water 对样品进行适当稀释。建议进行加标实验，以评估是否存在因样本抑制导致的假阴性情况。具体加标样品中终 DNase I 浓度建议为 2 \times 10⁻⁵U/ μ L。选择合适稀释倍数时需要注意，如果 UnK 严重污染了 DNase 或含有干扰物质时，可能会出现 RFU₀ (UnK) > RFU₀ (PC2)，且 RFU₃₀ (UnK) < 2 \times RFU₀ (UnK)，导致假阴性结果的情况，说明当前稀释倍数不适合进行样本检测，需要做进一步稀释或处理。

b. 检测：

提前 10min，预热酶标仪。立即读取 0min 时的荧光信号值 RFU₀。37 $^{\circ}$ C 避光放置 30min 后，再次读取 30min 时的荧光信号值 RFU₃₀，若采用动力学模式，则可读取 0~30min 所有荧光信号。

c. 结果判读：

若 NC 的荧光值孵育前后变化不超过 50%，PC2 的 RFU₃₀ 远大于 2RFU₀，且 UnK 的 RFU₃₀ \geq 2RFU₀，则判定 UnK 被 DNase 污染。

2) 定量检测：

a. 样品制备：

DNase I 标准品制备：

稀释分 2 步进行：先使用 Dilution buffer 2 将标准品稀释成 10×母液，再使用 DNase&RNase free water 将 10×母液稀释成终浓度。具体稀释建议见下表。

稀释 1:

管号	Dilution Buffer 2 的体积 (μL)	加入的标准品体积 (μL)	终浓度 (U/μL)
a	198μL	2μL DNase I (2U/μL)	2×10^{-2} U/μL
b	198μL	2μL a	2×10^{-4} U/μL
c	100μL	100μL b	1×10^{-4} U/μL
d	100μL	100μL c	5×10^{-5} U/μL
e	100μL	100μL d	2.5×10^{-5} U/μL
f	100μL	100μL e	1.25×10^{-5} U/μL

表 5: DNase I 标准品稀释 1

稀释 2:

管号	DNase&RNase free water 的体积 (μL)	加入的标准品体积 (μL)	终浓度 (U/μL)
STD-A	180μL	20μL c	1×10^{-5} U/μL
STD-B	180μL	20μL d	5×10^{-6} U/μL
STD-C	180μL	20μL e	2.5×10^{-6} U/μL
STD-D	180μL	20μL f	1.25×10^{-6} U/μL
STD-E	200μL	0	0 U/μL

表 6: DNase I 标准品稀释 2

b. 反应体系制备：实验共设置 3 种样本进行检测，包括 1 个阴性对照 (NC)，DNase I 标准品和待测样品 (UnK)。先根据总样本数量计算需要制备的反应溶液体积 (20μL/孔)：

组分编号	组分名称	反应溶液体积		
		1 个孔	10 个孔	N 个孔
/	DNase Substrate Work solution	10 μL	110 μL	$10 \times (N+1)$ μL
C	10× Reaction buffer	10 μL	110 μL	$10 \times (N+1)$ μL

表 7: 反应溶液体系配制 (定量实验)

再根据样本数量把制备好的反应溶液分装到各孔中，20μL/孔。随后向各孔中加入对应样品：

组分编号	样品名称	体积		
		NC	DNase I 标准品	UnK
F	DNase&RNase free water	80 μL	/	/
/	表 6 中制备的 STD A~G	/	80 μL	/
/	待测样品 (UnK) **	/	/	80 μL

表 8: 样品添加 (定量实验)

****待测样品 (UnK)：** 需要根据实际待测样本的情况，考虑是否需要用 DNase&RNase free water 对样本进行适当稀释。建议进行加标实验，以评估是否存在因样本抑制导致的假阴性情况。具体加标样品中终 DNase I 浓度建议为 5×10^{-6} U/μL。选择合适稀释倍数时需要注意，如果 UnK 严重污染了 DNase 或含有干扰物质时，可能会出现 $RFU_{30}(\text{UnK}) > RFU_0(\text{PC2})$ ，且 $RFU_{30}(\text{UnK}) < 2 \times RFU_0(\text{UnK})$ ，导致假阴性结果的情况，说明当前稀释倍数不适合进行样本检测，需要做进一步稀释或处理。

推荐的板布局：

板布局	1	2	3	4	5	6~12
A	STD-A	STD-A		UnK-1	UnK-1	
B	STD-B	STD-B		UnK-2	UnK-2	
C	STD-C	STD-C		UnK-3	UnK-3	
D	STD-D	STD-D		UnK-4	UnK-4	
E	STD-E	STD-E		UnK-5	UnK-5	
F				UnK-6	UnK-6	
G				UnK-7	UnK-7	
H	NC	NC		UnK-8	UnK-8	

表 9: 推荐的板布局

c. 检测:

提前 10min, 预热酶标仪。立即读取 0min 时的荧光信号值 RFU_0 。37°C 避光放置 30min 后, 再次读取 30min 时的荧光信号值 RFU_{30} , 若采用动力学模式, 则可读取 0~30min 所有荧光信号。

d. 结果判读:

计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$, 以 ΔRFU (STD A~G) 为纵坐标, 标准品 DNase I 浓度为横坐标进行线性拟合, 求出拟合方程 $y = ax + b$, 相关系数 $r \geq 0.99$, 将 ΔRFU (UnK) 作为 y 带入方程, 求出 x , 乘以样本稀释倍数后, 即为样本中 DNase 的浓度值。

*因仪器信号波动, 可能会出现 $\Delta RFU < 0$ 的情况, 此时按 $\Delta RFU = 0$ 计算。

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估, 具体可联系翊圣技术人员获取相应的性能验证报告。

注意事项

- 1) 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书;
- 2) 请在有效期内使用该产品, 禁止不同批次的相关试剂进行混用;
- 3) 所有试剂在使用之前, 均需要恢复至室温;
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
- 5) 本产品仅用作科研用途。