

UCF.ME® UltraNuclease ELISA Kit

全能核酸酶检测试剂盒

产品简介

UCF.ME® UltraNuclease（全能核酸酶），又称非限制性核酸内切酶、广谱核酸酶；是一种来源于 *Serratia Marcescens* 的非特异性核酸内切酶，可在链内任意核苷酸间进行切割，将核酸完全消化成 2-5 个碱基长度的 5'-单磷酸寡核苷酸，能够在非常广泛的条件下(6 M Urea, 0.1 M Guanidine HCl, 0.4% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)降解各种形式的（双链、单链、线状、环状、天然或变性）DNA 和 RNA，广泛用于去除生物制品中的核酸。后续也可以通过相应的方法去除 UCF.ME® UltraNuclease。

本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫检测（夹心 ELISA）原理检测变性与非变性的 UCF.ME® UltraNuclease 全能核酸酶的残留，用抗 UCF.ME® UltraNuclease 的兔多克隆抗体包被微孔板，形成固相抗体，向固相抗体酶标板(36701-A)中加入 UCF.ME® UltraNuclease 标准品(36701-C)和待测样品，然后加入稀释后的生物素标记的全能核酸酶检测抗体(36701-B)，最后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SA-HRP) (36701-D)，形成抗体+抗原+抗体-Biotin + SA-HRP 复合物，洗板后加入 TMB 显色液(36701-H)显色。TMB 在 HRP 酶的催化下由无色转化成蓝色并在终止液(36701-I)的作用下最终转化成黄色。黄色的深浅与样品中被检测到的 UCF.ME® UltraNuclease 的量呈正相关。

产品信息

货号	36701ES59
规格	96 T

组分信息

组分编号	组分名称	36701ES96
36701-A	酶标板	1 Plate
36701-B	Detection Antibody: Biotin-conjugated Rabbit Anti-UltraNuclease Antibodies	10 µL
36701-C	Standard: UCF.ME® UltraNuclease	1 vial (500 ng/mL)
36701-D	HRP-conjugated Streptavidin	10 µL
36701-E	Dilution Buffer 1	45 mL
36701-F	20×Wash Buffer	50 mL
36701-G	Dilution Buffer 2	50 mL
36701-H	TMB	15 mL
36701-I	Stop Solution	10 mL
36701-J	封板膜	5 片

储存条件

2~8°C 保存，未拆封有效期 1 年，拆封后有效期 1 个月。

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。

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：

- a. 量筒、1000 mL 烧杯、不同规格的 EP 管
- b. 无尘纸（用于洗板后拍板）
- c. 无菌吸头
- d. 样本前处理板
- e. 去离子水或双蒸馏水

2) 本试剂盒未提供，但实验所需的实验设备和仪器：

- a. 37°C恒温箱
- b. 全自动洗板机（可选）、涡旋混匀仪、离心机
- c. 不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器
- d. 计时器、4°C冰箱
- e. 酶标仪（如：Molecular Devices：M 和 i 系列）在 450 nm 测量吸光度(参比波长 630 nm)

2. 实验方法

1) 试剂、抗体准备

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。

a. 1×Wash Buffer 配制：

浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀后根据所需的量，用超纯水按 1:20 的比例，将浓缩洗液(20×)稀释 20 倍，最终得到 1×洗液。如：取 50 mL 浓缩洗液即 20×Wash Buffer 加入 950 mL 超纯水中，配成 1000 mL 1×洗液。若 20× Wash Buffer 中出现结晶，在 50°C 的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。

b. Detection Antibody 配制：

使用前 10000 rpm 离心 20 sec，然后用 Dilution Buffer 2 将检测抗体以 1:2500 稀释至工作浓度使用。

c. Streptavidin-HRP 配制：

使用前 10000 rpm 离心 20 sec，然后用 Dilution Buffer 2 以 1:5000 稀释至工作浓度使用。

2) 标准品溶液制备

提前准备 8 个无菌的 1.5 mL 离心管，按照标准品浓度依次进行标记。移取 994 μ L Dilution Buffer 1 至标记为 3 ng/mL 的离心管中，其余各管移取 500 μ L。根据标准品储存液浓度计算 3 ng/mL 标准品应移取的储液体积，加至标记为 3 ng/mL 的离心管中混匀。再取 500 μ L 至下一个标记浓度的离心管中，混匀，进行一系列 2 倍梯度稀释样品。

起始最高浓度标记 3 ng/mL，最低浓度为 0.047 ng/mL，可按照下面的配制方法来进行。每次试验均需制备相应的标准曲线，不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时，每个孔所需样品量为 100 μ L，注意配制体积要高于所需体积，避免体积使用量不足。

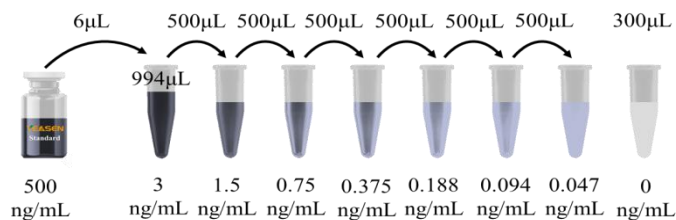


图 1 UCF.ME® UltraNuclease 标准品制备流程图

管号	Dilution Buffer 1 体积(μL)	加入的标准品和体积(μL)	标准品终浓度(ng/mL)
A	994	6 (500 ng/mL)	3
B	500	500 A	1.5
C	500	500 B	0.75
D	500	500 C	0.375
E	500	500 D	0.188
F	500	500 E	0.094
G	500	500 F	0.047
H	300	0	0=Blank

表 1 UCF.ME® UltraNuclease 标准品体系配制 (酶标仪检测 0.047~3 ng/mL)

3) 待测样本制备

将样本按照一定的稀释倍数进行稀释。样本具体的稀释倍数，需要通过样本加标，评估加标回收率和稀释线性后，确定合适的稀释倍数。

4) 实验步骤

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行双复孔测定。

- a. 试剂准备：提前准备好各种待测试剂、稀释好的标准品和待测样本。
- b. 酶标板条确定：计算待测样本和标准品所需酶标板条，将酶标条从铝箔袋取出，剩余的酶标条放回铝箔袋中并封好袋口，低温保存。
- c. 清洗酶标板：用 $1 \times$ Wash Buffer (300 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 洗板三次，拍干酶标板。洗板对实验结果有重要影响，确保最后一次拍板没有洗液残留。
- d. 孵育样本：加入标准品和待测样本，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，确保 15 min 内完成点样， 37°C 孵育 1 h。
- e. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 $1 \times$ Wash Buffer (300 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 洗板五次，拍干酶标板。
- f. Detection Antibody 即 Biotin-conjugated Antibodies 孵育：将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 孵育 1 h。
- g. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 $1 \times$ Wash Buffer (300 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 洗板五次，拍干酶标板。
- h. HRP-conjugated Streptavidin 孵育：将预先配制至工作浓度的偶联 HRP 的链霉亲和素加入酶标板，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 孵育 40 min。
- i. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 $1 \times$ Wash Buffer (300 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 洗板五次，拍干酶标板。
- j. 显色：使用前 10 min 将底物液恢复至室温，将底物液 TMB 加入酶标板中，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 避光孵育 15 min。
- k. 终止：加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止液至酶标板中，轻轻震动酶标板至显色均匀。
- l. 读值：20 min 内读取 450 nm/630 nm 波长处的吸光度值。450 nm 作为检测波长，630 nm 作为参比波长。

5) 结果分析

- a. 如果待测样本 OD 值超出标准曲线最高点 OD 值，需将样本进行稀释后重新测定。
- b. 曲线制定：以标准品浓度为横坐标，校准后的标准品吸光度值 (OD 450 nm-630 nm) 为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往曲线拟合效果较好，其它方法如线性，双对数法也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。最终依据标准曲线和样本的稀释倍数计算样本中宿主蛋白浓度。
- c. 典型的参考标准曲线如下 (以下标准曲线图仅供参考，应以同次实验标准品所绘标准曲线计算样本含量)：

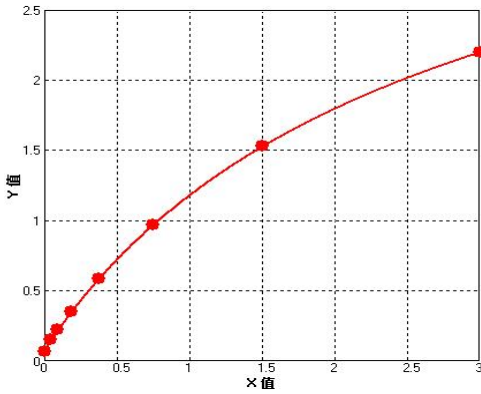


图 2: UCF.ME® UltraNuclease 标准曲线图

标曲 (ng/mL)	OD	平均 OD	校准值
3.000	2.205	2.189	2.197
1.500	1.520	1.543	1.532
0.750	0.974	0.962	0.971
0.375	0.579	0.588	0.584
0.188	0.353	0.351	0.352
0.094	0.228	0.221	0.225
0.047	0.154	0.155	0.150
0.000	0.070	0.067	0.074

表 2 UCF.ME® UltraNuclease 标准曲线数据

6) 实验流程图

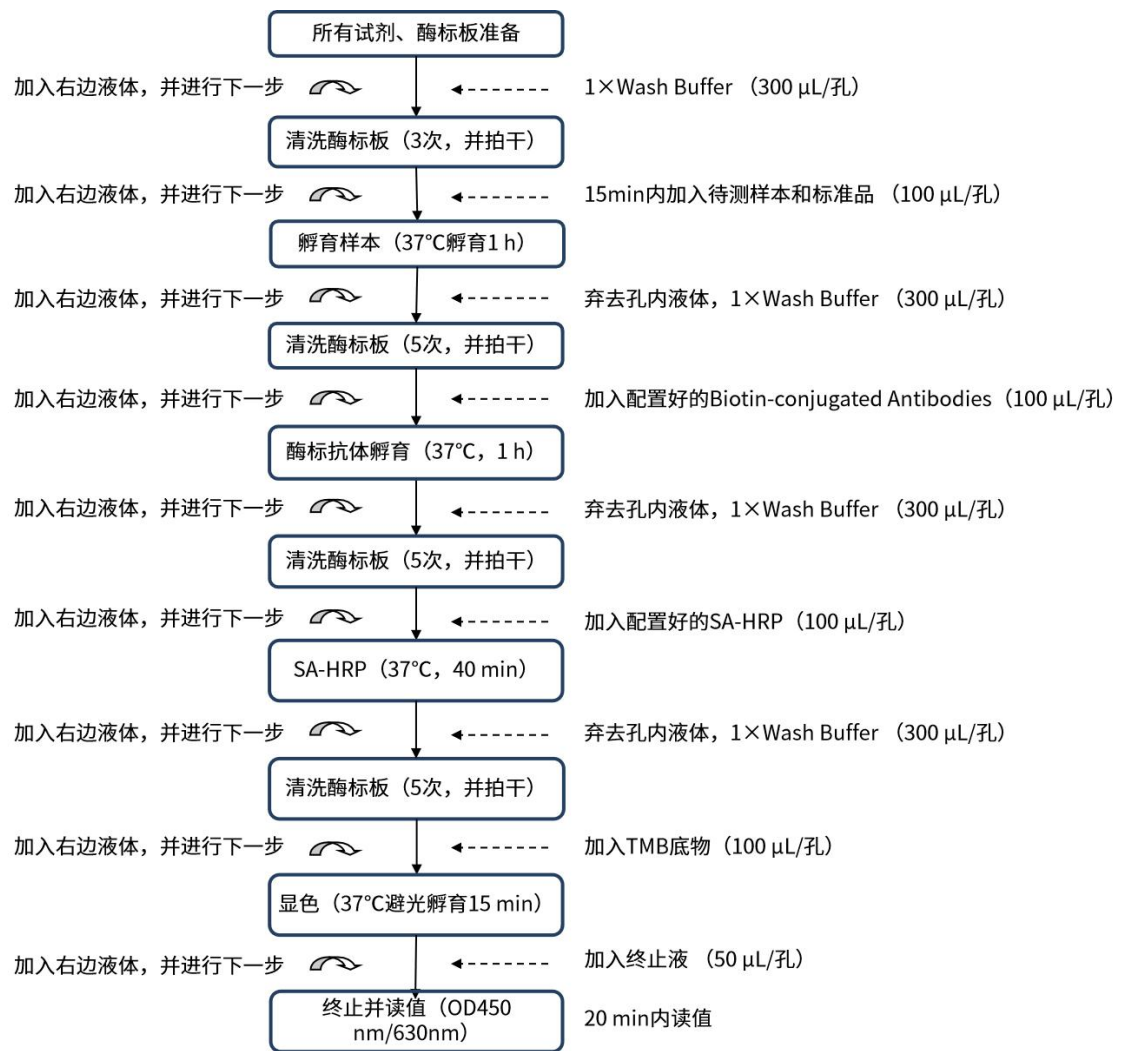


图 3: 实验步骤流程简图

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估，标曲范围为 0.047~3 ng/mL，板内精密度 CV<10%和板间精密度 CV<15%，准确度满足 75%~125%范围，检测限为 0.0235 ng/mL (即 23.5 pg/mL)。

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) 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性；
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6) 本产品仅用作科研用途。