

resDetect™核糖核酸酶 (RNase) 残留试剂盒 (荧光分析法)

货号: ASE-A001

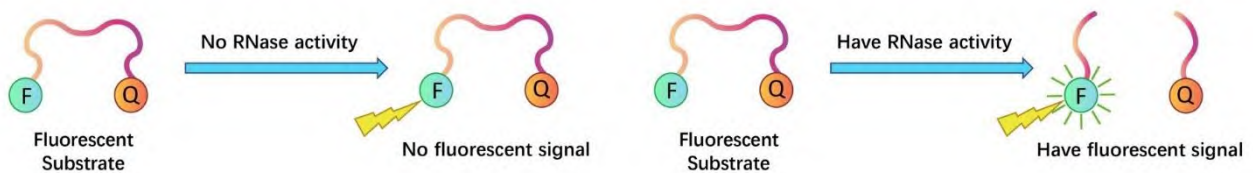
规格: 96 tests / 480 tests

背景介绍

核糖核酸酶 (RNase) 是一类能将 RNA 水解的酶, 核糖核酸酶分为两类: 核糖核酸内切酶和核糖核酸外切酶。RNase 在环境中无处不在, 特别是在一些生物材料中, 它以相对较高的浓度存在。RNase 还经常污染常见的分子生物学试剂, 如反应缓冲液、酶, 如逆转录酶和 RNA 聚合酶, 以及用于 RNA 纯化和储存的缓冲液。在实验中, 通常使用 DEPC 或加热去除 RNase。微量的 RNase 污染就会破坏实验, 因此有必要用核糖核酸酶 (RNase) 残留试剂盒评估 RNase 的存在。

检测原理

本试剂盒基于 FRET 实验原理, 采用一种 RNA 荧光探针作为底物, 当样本中不含 RNase 时, RNA 荧光探针是完整的, 此时荧光报告基团和淬灭基团距离较近, 不产生荧光信号。当样本中含 RNase 时, RNA 荧光探针被降解, 荧光报告基团和淬灭基团远离, 荧光报告基团发出荧光, 荧光信号随时间和 RNase 浓度的增加而增强, 使用酶标仪读取激发波长为 490nm, 发射波长为 520nm 的荧光, 从而判断样本是否被 RNase 污染, 荧光信号提升的速率与 RNase 污染的量 and 活性成正相关。



应用说明

核糖核酸酶 (RNase) 残留试剂盒 (荧光分析法) 是一种用于检测缓冲液、试剂和其他成分中 RNase 的存在工具。

试剂盒组分

ID	组份名称	规格 (96 T)	规格 (480 T)	存储条件
ASE1-C01	RNase Substrate	2 nmol	10 nmol	-20°C, 避光
ASE1-C02	10xReaction Buffer for RNase	10 mL	10 mL	-20°C
ASE1-C03	RNase A (10 µg/mL)	100 µL	500 µL	-20°C
ASE1-C04	TE Buffer (pH 7.0)	1.5 mL	6 mL	-20°C
ASE1-C05	Nuclease-free Water	10 mL	50 mL	-20°C

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

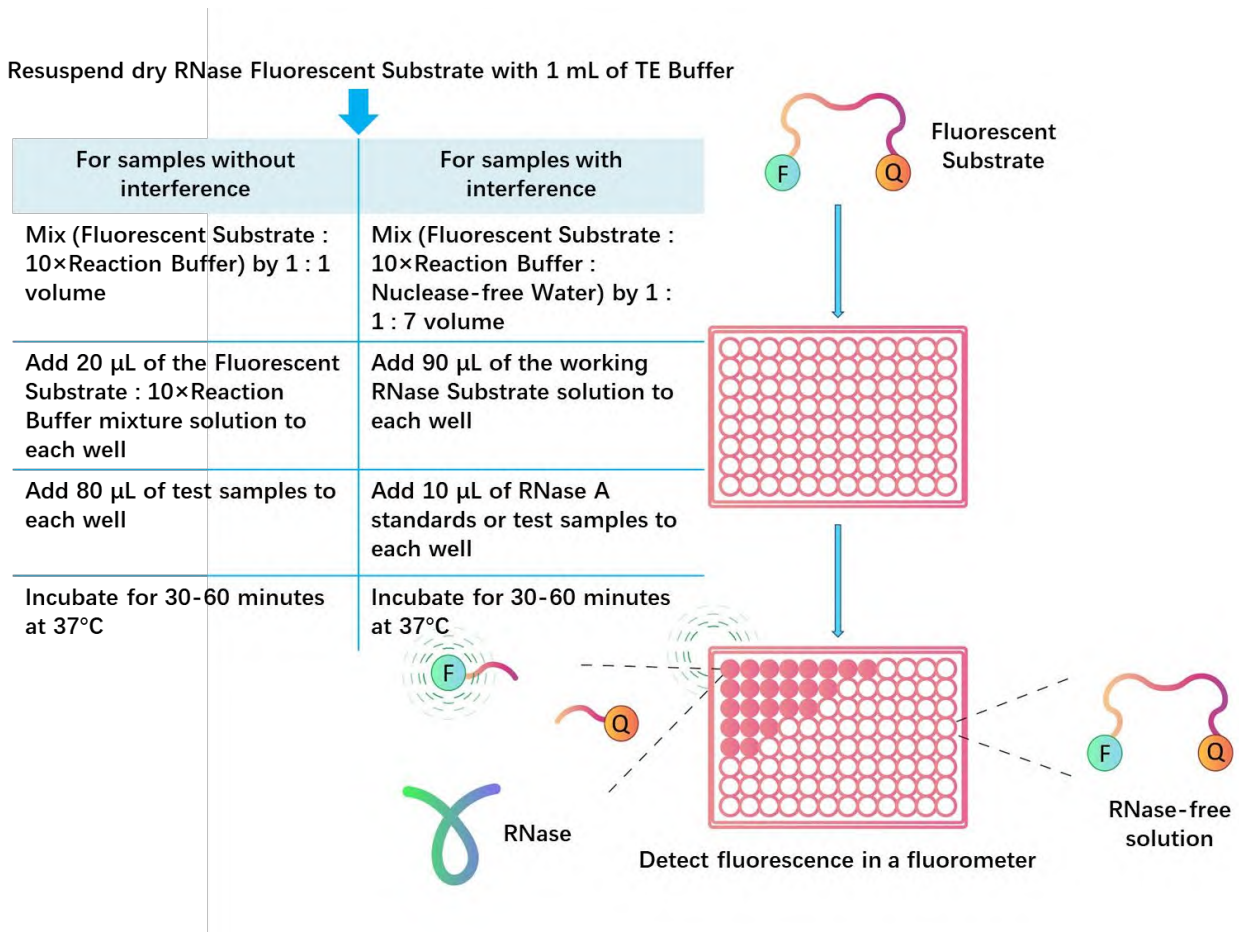
未提供的必需物料

物料名称	描述	参考来源
无核酸酶移液器和枪头	无核酸酶	例如瑞宁的移液器和枪头
无核酸酶 96 孔黑色酶标板	无核酸酶的黑色不透明 96 孔板，最低的背景信号	例如康宁 96 孔黑色酶标板（货号 3924），或者范德的黑色中吸附酶标板（货号 BI-E8B-Z）
无核酸酶 EP 管	无核酸酶	-
96 孔板式荧光读数仪	能够在动态模式下测量两个或更多荧光波长的读板器	例如 BMG CLARIOstar 的 Plus Multi-Mode Microplate Reader

运输和储存条件

1. 试剂盒在干冰条件下运输。
2. 未开封：试剂盒保存于-25~-15℃，试剂盒自生产之日起有效期为 12 个月，有效期见外包装箱标签。
3. 已开封：试剂盒开封后各组分保存于-25~-15℃，有效期自开封之日起为 3 个月。
4. 试剂盒中的 RNase Substrate 重构后若不能立即使用完毕，请保存在-25~-15℃且冻融次数不超过 3 次。
5. 不要使用过期试剂。

流程概览



If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

实验前准备

1. 实验环境

为了确保实验的准确性，实验环境要求操作过程不引入额外的 RNase。在您开始之前，实验室可以进行 30 分钟的紫外线消毒，实验操作在超清洁工作台（ISO5）上进行，清洁超清洁工作台中的操作表面，并打开超清洁工作平台进行 30 分钟以上的紫外线照射。

2. 清洁设备表面，如果要使用荧光计，请将其打开并设置以下参数

模式	使用 96 孔板的动力学模式（如果可用）
最大激发光/最大发射光	490/520nm
增益值（Gain）	如果可能，将增益设置为自动缩放或者最初使用设置成中等增益值。 注：不同仪器的设置方法不一致，请咨询仪器供应商了解详情。
数据收集	每 1-1.5 分钟收集一个数据点，使用间歇性数据收集
反应温度	37°C

3. 原材料

准备实验所需的原材料和工具，例如无核酸酶的移液器和吸头、黑色 96 孔不透明酶标板、EP 管，具体原材料要求，请参考第 2 页的“未提供的必需物料”。

4. 试剂

拿出试剂盒，并将各溶液组分以及 RNase A 标准品平衡至室温，确保所有溶液组分（10×Reaction Buffer, TE Buffer, Nuclease-free Water and RNase A standard）都能彻底解冻并混合均匀。

5. RNase Substrate Solution (2 nmol/mL)

用试剂盒提供的 1 mL TE Buffer (pH 7.0) 重构 1 管 RNase Substrate 的干粉，轻轻混合，在冰盒上静置 30 min，充分溶解 RNase Substrate。重构后的 RNase Substrate 溶液若是不能在一次内立即用完，请保存在 -25~-15°C，并且避免超过 3 次的反复冻融。

实验过程

1. 准备稀释液（1×Reaction Buffer）

计算所需的 1×Reaction Buffer 的体积，例如，当需要 1 mL 1×Reaction Buffer 时，将 0.1 mL 10×Reaction Buffer 加入到 0.9 mL Nuclease-free Water 中。

2. 准备样品

样品所需的加样体积是每孔 10μL 或 80 μL，加样的体积可根据样品类型以及是否存在干扰来确定：

1) 当测定水样品例如工艺用水、注射水等，在没有干扰的情况下，可以加样 80 μL。

2) 当测定固体表面，如移液器吸头，pH 电极，玻璃颗粒以及其他固体表面等等，建议加样 80 μL，若是移液器枪头，可以将其浸入 Nuclease-free Water（无核酸酶的水）吹吸 10 次并浸在水中几分钟，若测试其他固体，用无核酸酶的棉签擦拭固体表面并浸在水中几分钟，收集浸泡样本的溶液，液体的体积应不小于 80μL，通常收集的液体中不含干扰物质，若最终的样品测试体积不够，可以用试剂盒提供的 Nuclease-free water 将样品稀释到 80 μL 以上，再加样。

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

当加样体积是 80 μL 的时候，可以按照以下方法 1 进行测试，详细的底物工作溶液准备过程请参考“4. 准备底物工作溶液”：

将 2nmol/mL 的 RNase Substrate 和 10 \times Reaction Buffer 按 1:1 等体积混合均匀，将混合溶液以每孔 20 μL 的体积加到无核酸酶的 96 孔黑色酶标板中，再加 80 μL 检测样本，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min 到 1 小时。

3) 所有浓度高于最高标准 (Std 7) 的样品必须在 1 \times Reaction Buffer 中稀释。由于核酸酶活性受 pH 值和盐的影响很大，您需要知道样品的确切成分和溶液的不相容性，一些样品可能需要稀释以减少干扰，样品和溶液的具体要求可以参考第 11 页的“[常见问题与解答](#)”。如果您的样品是冻干粉末，需要按照 COA 重构样品，并注意任何重构的溶液和水都应不含核酸酶。

当待测的样本中含有干扰成分，或者待测样本需要被稀释的时候，建议按 10 μL 样本体系加样，可以用 1 \times Reaction Buffer 稀释样本，并按照以下方法 2 进行测试，详细的底物工作溶液准备过程请参考“4. 准备底物工作溶液”：

准备工作溶液：在无酶的管中加等体积 RNase Substrate 和 10 \times Reaction Buffer 和 7 倍体积 Nuclease-free Water (例如：10 μL 的 RNase Substrate 和 10 μL 的 10 \times Reaction Buffer 加到 70 μL 的 Nuclease-free Water 中，配制成 90 μL 的工作溶液)。

将工作溶液以每孔 90 μL 的体积加到无核酸酶的 96 孔黑色酶标板中，然后加 10 μL RNase A 标品或检测样本，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min 到 1 小时。

样品类型	建议加样体积	样品处理	RNase 底物工作溶液
水	80 μL	直接加样	将 2nmol/mL 的 RNase Substrate 和 10 \times Reaction Buffer 按 1:1 等体积混合均匀，每孔加 20 μL
固体表面	80 μL	用 nuclease-free water 处理固体表面再测试	
含干扰或需要被稀释的样品	10 μL	用 1 \times Reaction Buffer 稀释样本再测试	每孔加 90 μL RNase 底物工作溶液

备注：应测定每个待测样品的回收率，且回收率应在合理范围内 (如 80% ~ 120%)，详细回收测定过程请参考参考第 11 页的“[常见问题与解答](#)”。

3. 准备 RNase A 标品

每孔需要 10 μL 标准溶液，建议标准品做至少 2 个复孔。用 1 \times Reaction Buffer 梯度稀释 RNase A 标准储备溶液，用于制备标准品。为了避免引入额外的 RNase A，所有枪头和 EP 管以及其他耗材都应无核酸酶，所有缓冲液也应无核酸酶。为了防止任何粘壁，我们建议每次稀释到下个梯度时更换枪头。

建议 RNase A 标准品稀释过程如下所示 (稀释液建议用 1 \times Reaction Buffer)：

- 1) 解冻 RNase A 标准品并平衡至室温，RNase A 标准品的初始浓度是 10 $\mu\text{g/mL}$ ；
- 2) 准备标准品储存液 Stock1：用 1 \times Reaction Buffer 将 10 $\mu\text{g/mL}$ RNase A 标准储备溶液稀释 50 倍至 200 ng/mL (Stock1)：取 2 μL 的标准品储存液，加入到 98 μL 的 1 \times Reaction Buffer 中 (Stock1)，轻柔混合均匀；

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

3) 再准备标准品储存液 Stock2: 用 1×Reaction Buffer 将 200 ng/mL RNase A 标准储备溶液 Stock1 稀释 20 倍至 10 ng/mL (Stock2): 取 5 μL 的标准品储存液 Stock1, 加入到 95 μL 的 1×Reaction Buffer 中 (Stock2), 轻柔混合均匀;






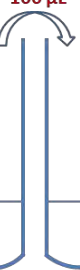





4) 准备标准曲线的最高浓度点 Std 7 (200 pg/mL) : 用 1×Reaction Buffer 将 10 ng/mL 标准储备溶液 (Stock2) 稀释 50 倍至 200 pg/mL: 取 5 μL 的 Stock2 加入到 245 μL 的 1×Reaction Buffer 中;

5) 最后, 按使用标曲最高浓度点 (Std 7: 200 pg/mL) 2 倍梯度稀释制备标准曲线, 如下所示 (以标品每个浓度点稀释体积为 200 μL 为例):

- 在 std 6 到 std 1 的管中分别加 100 μL 1×Reaction Buffer;

- 加 100 μL Std 7 到 100 μL 1×Reaction Buffer 中 (Std6), 轻柔混合均匀并重复连续梯度稀释, 制成 7 个 RNase A 标准液: std 6, std 5, std 4, std 3, std 2, std 1, Std 0 (阴性对照), 确保每步稀释混合均匀;

- Std 0 (阴性对照) 是 1×Reaction Buffer。

Tubes/ Solution Code	RNase Stock Solution	Stock 1	Stock 2	Std 7	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating											
Solution Conc.	10 μg/mL	200 ng/mL	10 ng/mL	200 pg/mL	100 pg/mL	50 pg/mL	25 pg/mL	12.5 pg/mL	6.25 pg/mL	3.125 pg/mL	0 pg/mL
1×Reaction Buffer Vol.		98 μL	95 μL	245 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL

标准品	稀释倍数	稀释过程	最终浓度	每孔 RNase 量
Stock solution1 (Stock1)	50	2 μL 10μg/mL stock solution + 98 μL 1×Reaction Buffer	200 ng/mL	/
Stock solution2 (Stock2)	20	5 μL Stock1 + 95 μL 1×Reaction Buffer	10 ng/mL	/
Standard 7	50	5 μL Stock2 + 245 μL 1×Reaction Buffer	200 pg/mL	2 pg
Standard 6	2	100 μL Standard 7 + 100 μL 1×Reaction Buffer	100 pg/mL	1 pg
Standard 5	2	100 μL Standard 6 + 100 μL 1×Reaction Buffer	50 pg/mL	0.5 pg
Standard 4	2	100 μL Standard 5 + 100 μL 1×Reaction Buffer	25 pg/mL	0.25 pg
Standard 3	2	100 μL Standard 4 + 100 μL 1×Reaction Buffer	12.5 pg/mL	0.125 pg
Standard 2	2	100 μL Standard 3 + 100 μL 1×Reaction Buffer	6.25 pg/mL	0.0625 pg
Standard 1	2	100 μL Standard 2 + 100 μL 1×Reaction Buffer	3.125 pg/mL	0.03125 pg
Standard 0	-	100 μL 1×Reaction Buffer	0 pg/mL	0 pg

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

4. 准备底物工作溶液

- 1) 样品的加样体积是 80 μL ，每孔需要 10 μL 的 RNase Substrate 和 10 μL 的 10 \times Reaction Buffer，每孔终体积为 100 μL 。首先将 2 nmol/mL 的 RNase Substrate 和 10 \times Reaction Buffer 按 1:1 等体积混合均匀，将混合溶液以每孔 20 μL 的体积加到无核酸酶的 96 孔黑色酶标板中，再将样品和标准品每孔 80 μL 的体积加到对应孔中。例如，当实验孔的数量为 50 时，需要 1 mL RNase 底物工作溶液，我们可以制备 1.1 mL RNase 底物工作溶液以确保余量，将 550 μL RNase Substrate (2 nmol/mL) 和 550 μL 10 \times Reaction Buffer 混合，得到 1.1 mL RNase 底物工作溶液用于实验，可参考下表配制：

实验 Tests	每孔体积	RNase Substrate	10 \times Reaction Buffer	RNase 底物工作溶液总体积
50 Tests	20 μL /well	550 μL	550 μL	1100 μL

- 2) 当加样体积是 10 μL 时，每孔需要 90 μL 底物工作溶液。根据实验中的孔数计算 RNase 底物工作溶液所需的总体积。将等体积的 2 nmol/mL RNase Substrate 和 10 \times Reaction Buffer 加入 7 倍体积的 Nuclease-free Water 中。例如，当实验孔的数量为 50 时，需要 4.5 mL RNase 底物工作溶液，我们可以制备 4.95 mL RNase 底物的工作溶液以确保余量，将 550 μL RNase Substrate (2 nmol/mL) 和 550 μL 10 \times Reaction Buffer 添加到 3.85 mL Nuclease-free Water 中，可参考下表配制：

实验 Tests	工作溶液总体积	RNase Substrate	10 \times Reaction Buffer	Nuclease-free Water
50 Tests	4950 μL	550 μL	550 μL	3850 μL

5. 将上述制备的样品、标品、底物工作溶液加入孔板中，在微孔板振荡器上 500 rpm 振荡混匀 5-10 秒，将微孔板置于酶标仪中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应 30-60 min，并读取荧光值。

样品和标准品可按照以下方式加入：

实验中，建议标准曲线每个浓度点和待测样本均做复孔，如果需要加入自己的阳性参考品、阴性参考品，可以根据自己企业参考品的要求进行加样，通常阳性对照的测定孔数应不小于 1 个，阴性参考品的测定孔数应不小于 2 个：

- 1) 如果荧光读数仪可以实时检测动态数据：

向 96 孔板中每孔加入对应体积的 RNase 底物工作溶液，RNase A 标准品或样品，设置荧光读数参数为：在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中培养板 30~60 min，以收集实时数据。RNase 活性测定可在严格的动力学条件下进行评估。使用实时数据，可以使用酶速度测量来比较 RNase 活性。

- 2) 如果不需要进行实时动态检测 RNase 活性数据，可以通过终点检测方法，用酶标仪测定固定时间点的荧光值：

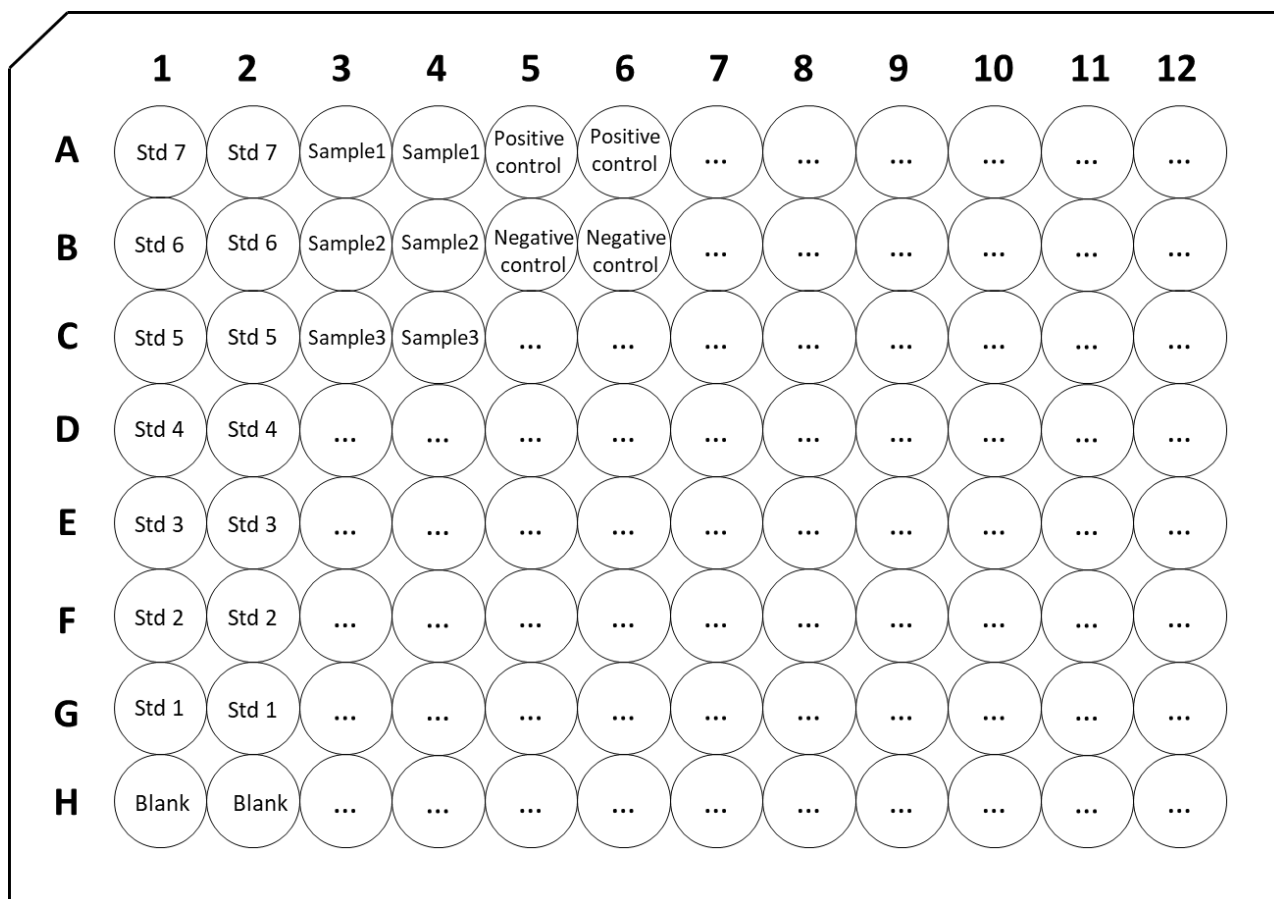
向 96 孔板中每孔加入对应体积的 RNase 底物工作溶液，RNase A 标准品或样品，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应 30~60 min，设置荧光读数参数，测定荧光值。

注：所有标准品和待测样品，应在同一个板子内，并设定相同的 Gain 值进行测定。

排版布局

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>



数据处理和说明

样本类型	预期结果
RNase 标准品	所有 7 个浓度的 RNase 标准品均应是阳性结果，将标准品 Std 0-Std 7 对应的荧光信号 RFU 作为纵坐标，将 RNase 标准品浓度作为横坐标，用四参数拟合方式进行拟合标准曲线，并计算得到拟合方程，且相关系数 R^2 应 ≥ 0.99 。
阳性参考品	样品参考品的信号应均为阳性，且根据标准曲线回算出的阳性参考品浓度应和实际值一致。
阴性参考品	所有阴性参考品检测的信号应均为阴性，且此信号和空白值基本一致。
待测样本	如果待测样本的信号值 $RFU \geq 2 \times RFU$ (Blank)，则判定为阳性或有 RNase 污染，如果样本中含有干扰物质，可能会导致错误的阴性结果，此时，可以用无酶水稀释样本，以减少干扰，再进行复测。
Blank（空白对照）	空白标准品 (Std 0)的信号值应尽可能低，由于读数设备不同，不同的酶标仪读出的 Blank 信号值也不一样，具体应根据设备参数进行判断。

典型数据

核糖核酸酶 (RNase) 残留试剂盒检测 RNase A 活性的实时动态数据

向 96 孔板中每孔加入 90 μL RNase 底物工作溶液(RNase Substrate、10×Reaction Buffer 和 Nuclease-free Water 按 1:1:7 体积混合), 然后加入 10 μL RNase A 标准品 (0-200 pg/mL×10 μL/well = 0-2 pg/well), 在 37°C 下以 1~1.5 分钟的间隔在荧光读数设备中 (BMG CLARIOstar) 反应并读数 30 分钟, 以收集实时数据。RNase 活性测定可在严格的动力学条件下进行评估。

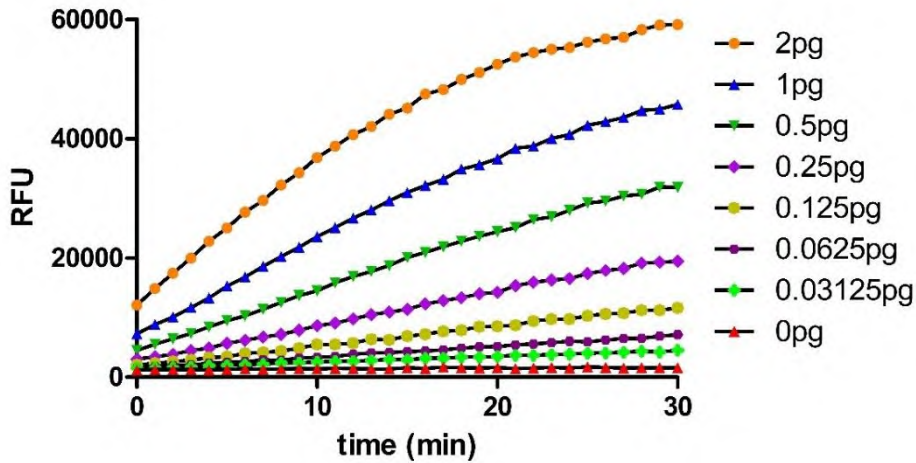


图 1 RNase A 活性检测实时动态图

核糖核酸酶 (RNase) 残留试剂盒的标准曲线

本试剂盒提供了 RNase A 活性的标准检测方法, 向 96 孔板中每孔加入 90 μL RNase 底物工作溶液 (RNase Substrate、10×Reaction Buffer 和 Nuclease-free Water 按 1:1:7 体积混合), 然后加入 10 μL RNase 标准品 (0-200 pg/mL×10 μL/well = 0-2 pg/well), 在 37°C 下孵育 30 分钟, 并在荧光读数设备 (BMG CLARIOstar) 中读取数据, 通过四参数拟合方式拟合数据并得到标准曲线。以下数据仅供参考。

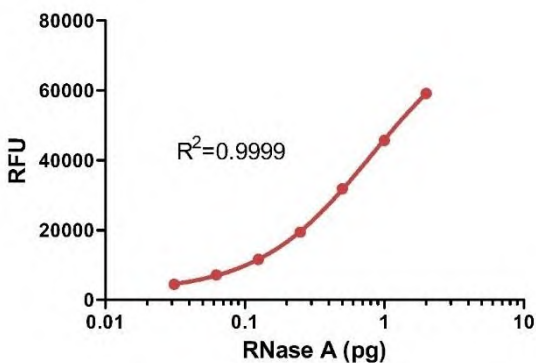


图 2 RNase A 标准曲线图

Std. weight (pg/well)	RFU-1	RFU-2	Ave (RFU)
0 pg	1560	1700	1630
0.03125 pg	4507	4172	4340
0.0625 pg	7145	6390	6768
0.125 pg	11640	10428	11034
0.25 pg	19411	18100	18756
0.5 pg	31812	28705	30259
1 pg	45714	43370	44542
2 pg	59114	56879	57997

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

检测性能

灵敏度

检测线性区间 (pg/well)	定量下限 (LoQ*)
0.03125-2 pg/well	0.03125 pg

批内差

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Number of Replicate	8	8	8	8	8	8	8
Mean RFU	3506	5964	9831	16862	27758	41779	56643
Standard Deviation	130	192	291	532	180	783	412
Coefficient of Variation (%)	3.7	3.4	3.0	3.2	0.6	1.9	0.7

批间差

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Number of Replicate	8	8	8	8	8	8	8
Mean RFU	3858	6132	10503	17609	28071	41161	53533
Standard Deviation	579	769	1495	2307	3341	4203	4249
Coefficient of Variation (%)	15	12.5	14.2	13.1	11.9	10.2	7.9

回收率

Sample	System	5.5 µg/mL of Pyrophosphatase (n=2)		1% of (50mM Tris-HCl and 50% Glycerol) (n=2)		2 µg/mL Thermostable Inorganic Pyrophosphatase (n=2)		1×Reaction Buffer (n=2)	
		Calculated weight. (pg)	Ave % RE	Calculated weight. (pg)	Ave % RE	Calculated weight. (pg)	Ave % RE	Calculated weight. (pg)	Ave % RE
Sample 1	1.5	1.4252	95	1.3319	89	1.3375	89	1.4193	95
Sample 2	0.2	0.1691	85	0.1669	83	0.1683	84	0.1839	92
Sample 3	0.05	0.0437	87	0.0461	92	0.0442	88	0.0472	94

注：所有溶液浓度对应是在 100uL 反应体系的终浓度。

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

常见问题与解答

1. 本试剂盒除了可以检测 RNase A，还可以检测哪些酶？

本试剂盒除了可以检测 RNase A，也适用于 RNase T1，RNase 1，微球菌核酸酶（micrococcal nuclease），全能核酸酶（Benzonase nuclease），绿豆核酸酶（mung bean nuclease）和 S1 核酸酶（S1 nuclease）的检测。

2. 哪些溶液不兼容于本试剂盒？

大部分的反应溶液和试剂可以用于此试剂盒的检测，一些不兼容的溶液如下表所示：

不兼容的溶液	说明
用于凝胶电泳的 loading buffers 和一些颜色深的溶液	颜色深的溶液可能会干扰荧光的激发并封闭发射光，导致无法测定。
抑制 RNase 活性的溶液	已知的抑制 RNase 活性的溶液如下： <ul style="list-style-type: none"> • 高离子浓度的溶液(例如：5 M NaCl, 20X SSC, 3 M 醋酸钠, 等.) • pH <4 或 pH >9 的溶液 • 促进剂, 洗涤剂, 螯合剂或任何使蛋白质变性的溶液 (例如: SDS, 硫氰酸胍, 尿素, EDTA, 等)
引起试剂盒化学降解不稳定的试剂溶液	一些化学降解底物 (RNase Substrate) 的溶液, 可能会导致测试出现假阳性信号。RNase Substrate 在以下类型的溶液中是不稳定的： <ul style="list-style-type: none"> • pH >9 的溶液 • 腐蚀性溶液 (强酸、强碱、漂白剂等)

3. 怎样确定样本溶液的兼容性？

- 1) 用标准的操作方法检测样本
- 2) 孵育反应结束后，若空白对照未出现荧光，加 5 μ L 试剂盒自带的 RNase A 进行反应，并重复孵育反应和测定信号，此时出现强的信号值，则说明溶液无干扰。

如果您的样品溶液干扰试剂盒分析，建议用 1 \times Reaction 缓冲液稀释样品，再加样测试，需要验证最小稀释系数以避免任何干扰。

4. 怎样测定样品的回收率？

应测定每个待测样品的回收率，且回收率应在合理范围内（如 80% ~ 120%），详细回收测定过程如下：

- 1) 本回收率测试实验可将本试剂盒提供的浓度在线性范围内的 RNase 标准品加入到待测样品中，添加的已知含量的 RNase 和来自样品本身的内源性 RNase 的总浓度应不超过标准曲线最高值 (Std 7)，相当于加标后的 RNase 的总量不超过每孔 2pg，若样品本身的内源性 RNase 浓度高于最高标准 (Std 7)，则先将样品稀释至线性范围浓度，再加入标准品进行回收测试，另外若待测样品中含有干扰成分，也需要稀释以减少干扰；

If you have any questions, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com

<http://www.acrobiosystems.com>

2) 当加样体积是 80 μL 时, 若样品体积不够 80 μL 时, 用 Nuclease-free Water 补齐需要的体积, 按 1:7 体积比将已知含量的 RNase 标准品加入到样品中, 由于加标后 RNase 的总量应在线性范围内 ($\leq 2\text{pg}$ /每孔), 建议加标后 RNase 的总浓度不超过 25pg/mL。例如, 加入 1 份 25 pg/mL 标准品到 7 份测试样品中, 混合后, 每孔加 80 μL , 相当于每孔增加了 0.25 pg RNase 标准品附加值。

首先, 按 1:7 体积比将 1 份 1 \times Reaction Buffer 到 7 份样品中, 混合后每孔加入稀释后的样品 80 μL , 用来测定样品本身的内源性 RNase 量 (M1), 然后按 1:7 的体积比将已知量的 RNase 标准品 (M2) 加入到样品中, 确定样品/标准品混合后的 RNase 总量 (M3), 回收率计算公式为: $(M3 - M1) / M2 \times 100\%$, 实验设计如下:

样品回收测试 ID	标品/Buffer : 样品的体积比	加入的组分和 体积/每孔	样品加样体积 /每孔	样本自身内源性 RNase 含量/每孔	添加的 RNase 标准品 含量/每孔	RNase 最终总量/每孔
Sample	1:7	1 \times Reaction Buffer 10 μL	70 μL	M1	0 pg	M1
Sample-R	1:7	Standard 4 (25 pg/mL) 10 μL /每孔	70 μL	M1	M2 = 0.25 pg	M3

3) 当加样体积是 10 μL 时, 样品若需要稀释, 用 1 \times Reaction Buffer 稀释样品, 按 1:1 体积比将已知含量的 RNase 标准品加入到样品中, 由于加标后 RNase 的总浓度应在线性范围内 ($\leq 2\text{pg}$ /每孔), 建议加标后 RNase 的总浓度不超过 200pg/mL。例如, 在 1 份测试样品中加入 1 份 50 pg/mL 标准品, 这将产生 25pg/mL 的附加浓度值, 混合后每孔加 10 μL , 相当于每孔增加了 0.25 pg RNase 标准品附加值。

任何来自样品本身的内源性 RNase 在加标前也应进行测定, 并通过该样品的 50% 稀释进行校正, 应从加标样品确定的值中减去, 并计算 RNase 的浓度以给出回收率。

例如, 为了确定稀释后样品的标准回收率, 首先, 按 1:1 体积比将 1 份 1 \times Reaction Buffer 到 1 份样品中, 混合后每孔加入稀释后的样品 10 μL , 用来测定样品本身的内源性 RNase 量 (M1), 然后按 1:1 的体积比将已知量的 RNase 标准品 (M2) 加入到样品中, 确定样品/标准品混合后的 RNase 总量 (M3), 回收率计算公式为: $(M3 - M1) / M2 \times 100\%$, 实验设计如下:

样品回收测试 ID	标品/Buffer : 样品的体积比	加入的组分和 体积/每孔	样品加样体积 /每孔	样本自身内源性 RNase 含量/每孔	添加的 RNase 标准品 含量/每孔	RNase 最终总量/每孔
Sample	1:1	1×Reaction Buffer 5 μL	5 μL	M1	0 pg	M1
Sample-R	1:1	Standard 5 (50 pg/mL) 5 μL	5 μL	M1	M2 = 0.25 pg	M3

5. 怎样测定固体表面？

移液器对应的枪头，pH 电极，玻璃颗粒以及其他固体表面的测试，可以将物体浸入反应混合物中几分钟（对于移液器枪头，则可以上下吸液几次），然后按照标准操作规程进行测试。

6. 如果实验出现假阳性或者假阴性该怎么解决？

- 1) 当实验出现假阳性，首先，排除下实验的耗材是否有核酸酶污染，其次检查下实验溶液是否有污染或是否对 RNase Substrate 有降解作用，确保实验耗材和溶液无核酸酶污染，再排除实验过程中是否有操作失误引入的额外的核酸酶。
- 2) 当实验出现假阴性，检查下实验溶液是否含有对核酸酶有抑制成分，不合适的溶液可能会导致阴性结果。