

## resDetect™ 脱氧核糖核酸酶 (DNase) 残留试剂盒 (荧光分析法)

货号: ASE-A002

规格: 96 tests / 480 tests

### 背景介绍

脱氧核糖核酸酶(DNases)是一种能够水解 DNA 分子磷酸二酯键的酶。根据在生化和生物学性质上不同,可以将它们分为两个家族: DNase I 和 DNase II 家族。DNases 的存在会影响 PCR 等许多实验结果,因此有必要对 DNases 的存在进行测定。

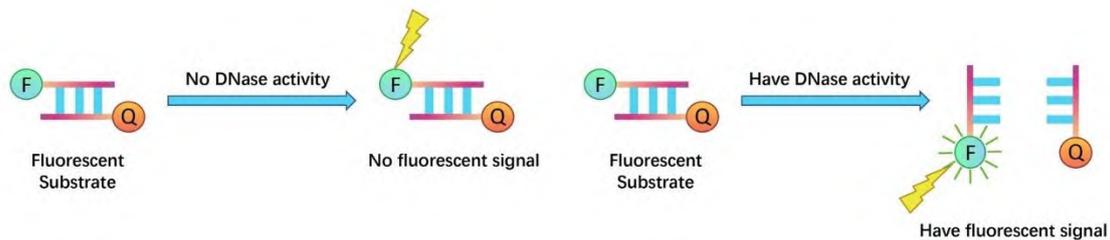
DNases 在环境中和很多生物材料中无处不在,许多分子生物学实验依赖于使用无 DNase 残留的塑料、化学品和溶液,由于 DNases 可以降解 DNA,一旦这些材料被 DNases 污染,实验就会受到影响。因为即使只有微量的 DNase 污染也会破坏实验,所以有必要用合理的方法来检测 DNases 的存在。

现有检测 DNase 的方法,如核酸水解凝胶电泳法和紫外分光光度计法,通常存在耗时长、无法准确定量、灵敏度低等问题。其他方法如高效液相色谱法(HPLC)和电化学方法受限于仪器设备。

相比之下,脱氧核糖核酸酶(DNase)残留试剂盒(荧光分析法)通过荧光探针法原理,能够在 30 分钟内快速定量检测 DNase,且试剂盒的灵敏度高,易操作。同时,脱氧核糖核酸酶(DNase)残留试剂盒(荧光分析法)和核糖核酸酶(RNase)残留试剂盒可以联用,同时定量检测单个样品中的 DNase 和 RNase。

### 检测原理

本试剂盒基于 FRET 实验原理,采用一种 DNA 荧光探针作为底物,当样本中不含 DNase 时,DNA 荧光探针是不被降解,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 DNase 时,DNA 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 DNase 浓度的增加而增强,使用酶标仪读取激发波长为 535nm,发射波长为 565nm 的荧光,从而判断样本是否被 DNase 污染。



### 应用说明

脱氧核糖核酸酶(DNase)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 DNase 的存在工具。

### 试剂盒组分

If you have any questions, please contact our technical support team at: [TechSupport@acrobiosystems.com](mailto:TechSupport@acrobiosystems.com)  
<http://www.acrobiosystems.com>

ID	组份名称	规格 (96 T)	规格 (480 T)	存储条件
ASE2-C01	DNase Substrate	2 nmol	10 nmol	-20°C, avoid light
ASE2-C02	10X Reaction Buffer for DNase	10 mL	10 mL	-20°C
ASE2-C03	DNase I (1 U/ $\mu$ L)	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	-20°C
ASE2-C04	TE Buffer (pH 8.0)	1.5 mL	6 mL	-20°C
ASE2-C05	Nuclease-free Water	10 mL	50 mL	-20°C

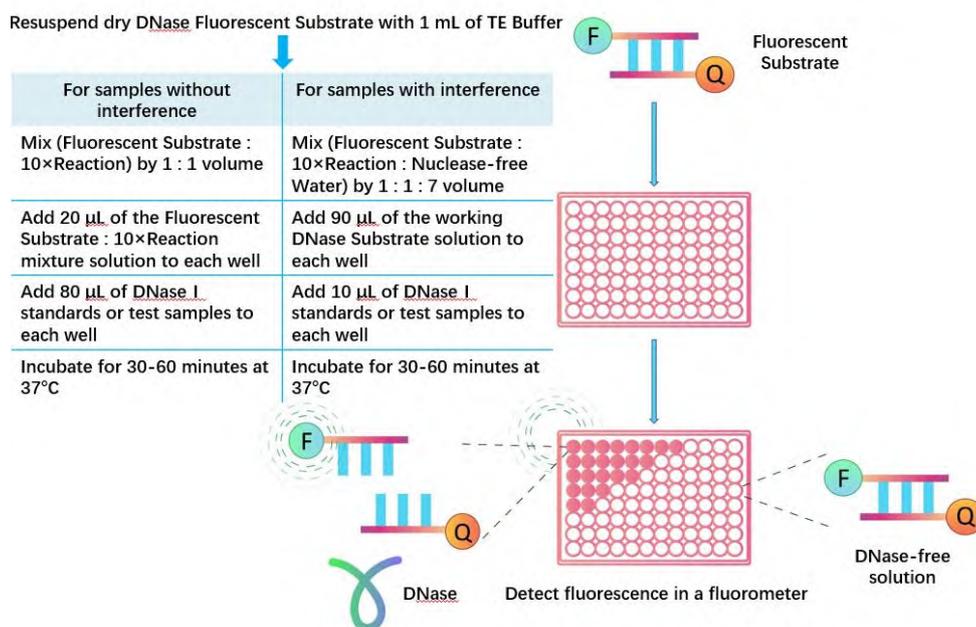
## 未提供的必需物料

物料名称	描述	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-20°C, 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-20°C, 有效期自开封之日起为 3 个月。
4. 试剂盒中的 DNase Substrate 重构后若不能立即使用完毕, 请保存在-25~-15°C 且冻融次数不超过 3 次。
5. 不要使用过期试剂。

## 流程概览



## 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 DNase。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	535/565nm
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 DNase I 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 DNase I standard)都能彻底解冻并混合均匀。

### 5. DNase Substrate Solution (2 nmol/mL)

用试剂盒提供的 1 mL TE Buffer (pH 8.0) 重构 1 管 DNase Substrate 的干粉，轻轻混合，在冰盒上静置 30min，充分溶解 DNase Substrate。重构后的 DNase 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

所有浓度高于最高标准 (Std 7) 的样品必须在 1×Reaction Buffer 中稀释。试剂盒可以测试不同类型的样品，例如一些生物材料、缓冲液和固体表面。由于核酸酶活性受 pH 值和盐的影响很大，您应该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 9 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都应不含核酸酶。

### 3. 准备 DNase I 标品

根据方法选择的不同，每孔需要 10 μL 或者 80 μL 标准溶液。用 1×Reaction Buffer 梯度稀释 DNase I 标准储备溶液，用于制备标准品。为了避免引入额外的 DNase I，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。

**If you have any questions, please contact our technical support team at: [TechSupport@acrobiosystems.com](mailto:TechSupport@acrobiosystems.com)**

**<http://www.acrobiosystems.com>**

当样本需要的体积是 10  $\mu\text{L}$  时，建议 DNase I 标准品稀释过程如下所示（稀释液建议用 1 $\times$ Reaction Buffer）：

将 DNase I (1 U/ $\mu\text{L}$ ) 标品平衡至室温。取 2  $\mu\text{L}$  的标准品储存液，加入到 98  $\mu\text{L}$  的稀释液中 (Stock1)。然后取 2  $\mu\text{L}$  的 Stock1，加入到 158  $\mu\text{L}$  的稀释液中 (Std 7: 0.00025 U/ $\mu\text{L}$ )，此浓度为标准曲线的最高浓度点。使用标曲最高浓度点 (Std 7: 0.00025 U/ $\mu\text{L}$ ) 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 100  $\mu\text{L}$  为例），加 50  $\mu\text{L}$  Std 7 到 50  $\mu\text{L}$  稀释液中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，制成 7 个 DNase I 标准液：std6, std5, std4, std3, std2, std1, Std 0 (阴性对照)。

Tubes/ Solution Code	DNase Stock Solution	Stock 1	Std7	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating										
Solution Conc.	1 U/ $\mu\text{L}$	0.02 U/ $\mu\text{L}$	0.00025 U/ $\mu\text{L}$	0.000125 U/ $\mu\text{L}$	0.0000625 U/ $\mu\text{L}$	0.00003125 U/ $\mu\text{L}$	0.000015625 U/ $\mu\text{L}$	0.0000078125 U/ $\mu\text{L}$	0.00000390625 U/ $\mu\text{L}$	0 U/ $\mu\text{L}$
1 $\times$ Reaction Buffer Vol.		98 $\mu\text{L}$	158 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

当样本需要的体积是 80  $\mu\text{L}$  时，建议 DNase I 标准品稀释过程如下所示（稀释液建议用 1 $\times$ Reaction Buffer）：

将 DNase I (1 U/ $\mu\text{L}$ ) 标品平衡至室温。取 2  $\mu\text{L}$  的标准品储存液，加入到 98  $\mu\text{L}$  的稀释液中 (Stock1)。然后取 5  $\mu\text{L}$  的 Stock1，加入到 195  $\mu\text{L}$  的稀释液中 (Stock2)。最后取 12.5  $\mu\text{L}$  的 Stock2 加入到 187.5  $\mu\text{L}$  的稀释液中 (Std 7: 3.125E-05 U/ $\mu\text{L}$ )，此浓度为标准曲线的最高浓度点。使用标曲最高浓度点 (Std 7: 3.125E-05 U/ $\mu\text{L}$ ) 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  $\mu\text{L}$  为例），加 100  $\mu\text{L}$  Std 7 到 100  $\mu\text{L}$  稀释液中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，制成 7 个 DNase I 标准液：std6, std5, std4, std3, std2, std1, Std 0 (阴性对照)。

Tubes/ Solution Code	DNase 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.	1 U/ $\mu\text{L}$	0.02 U/ $\mu\text{L}$	0.0005 U/ $\mu\text{L}$	3.125 E-05 U/ $\mu\text{L}$	1.563 E-05 U/ $\mu\text{L}$	7.813 E-06 U/ $\mu\text{L}$	3.906 E-06 U/ $\mu\text{L}$	1.953 E-06 U/ $\mu\text{L}$	9.766 E-07 U/ $\mu\text{L}$	4.883 E-07 U/ $\mu\text{L}$	0 U/ $\mu\text{L}$
1 $\times$ Reaction Buffer Vol.		98 $\mu\text{L}$	195 $\mu\text{L}$	187.5 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

#### 4. 准备底物工作溶液

当加样体积是 80  $\mu\text{L}$  时, 每孔需要 10  $\mu\text{L}$  的 DNase Substrate 和 10  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$ Reaction Buffer, 将 2 nmol/mL 的 DNase 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  $\mu\text{L}$  的体积加到无核酸酶的 96 孔黑色酶标板中。

当加样体积是 10  $\mu\text{L}$  时, 每孔需要 90  $\mu\text{L}$  底物工作溶液。根据实验中的孔数计算 DNase 底物工作溶液所需的总体积。将等体积的 2 nmol/mL DNase 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 20 时, 需要 1.8 mL DNase 底物工作溶液, 我们可以制备 1.89 mL DNase 底物的工作溶液以确保余量, 将 210  $\mu\text{L}$  DNase Substrate (2 nmol/mL) 和 210  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Reaction Buffer 添加到 1.47 mL Nuclease-free Water 中, 可参考下表配制:

实验 Tests	工作溶液总体积	DNase Substrate	10 $\times$ Reaction Buffer	Nuclease-free Water
8 Tests	810 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$	630 $\mu\text{L}$
20 Tests	1890 $\mu\text{L}$	210 $\mu\text{L}$	210 $\mu\text{L}$	1470 $\mu\text{L}$

#### 5. 将上述制备的样品、标品、底物工作溶液加入孔板中, 并读取荧光值。

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, 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:

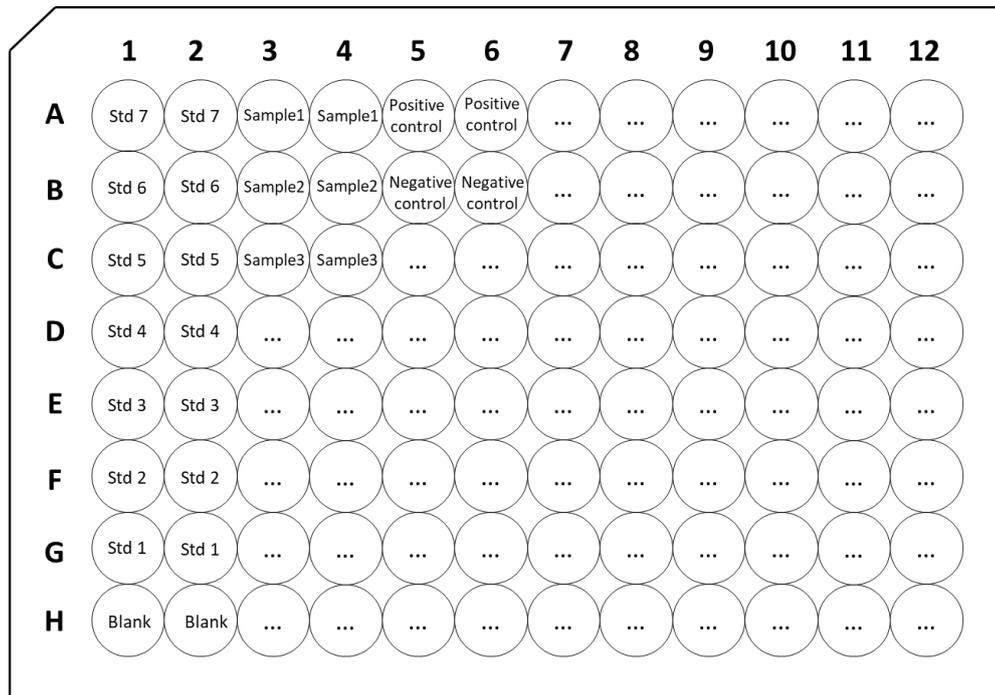
向 96 孔板中每孔加入对应体积的 DNase 底物工作溶液, DNase I 标准品或样品, 设置荧光读数参数为: 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中培养板 30~60 min, 以收集实时数据。DNase 活性测定可在严格的动力学条件下进行评估。使用实时数据, 可以使用酶速度测量来比较 DNase 活性。

##### 2) 如果不需要进行实时动态检测 DNase 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 DNase 底物工作溶液, DNase I 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



## 数据处理和说明

样本类型	预期结果
DNase 标准品	所有 7 个浓度的 DNase 标准品均应是阳性结果，将标准品 Std0-Std7 对应的荧光信号 RFU 作为纵坐标，将 DNase 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 $\geq 0.99$ 。
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 $RFU \geq 2 \times RFU(\text{Blank})$ ，则判定为阳性或有 DNase 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

**脱氧核糖核酸酶 (DNase) 残留试剂盒检测 DNase I 活性的实时动态数据**

向 96 孔板中每孔加入 90  $\mu\text{L}$  DNase 底物工作溶液，然后加入 10  $\mu\text{L}$  DNase I 标准品 (0.00000390625-0.00025 U/ $\mu\text{L}$  $\times$ 10 $\mu\text{L}$ /well = 0.0000390625-0.0025 U/well)，在 37 $^{\circ}\text{C}$  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。DNase 活性测定可在严格的动力学条件下进行评估。

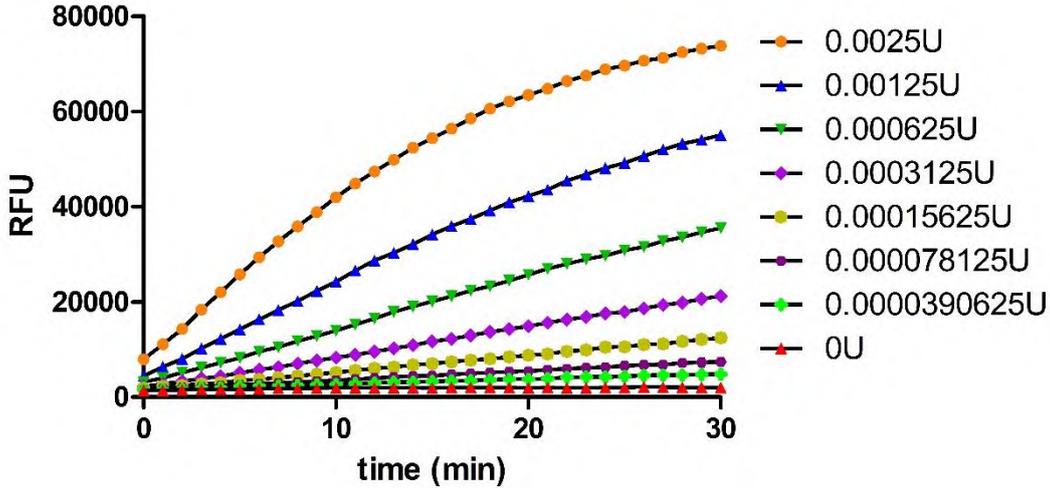


图 1 DNase I 活性检测实时动态图

**脱氧核糖核酸酶 (DNase) 残留试剂盒的标准曲线**

本试剂盒提供了 DNase I 活性的标准检测方法，向 96 孔板中每孔加入 90  $\mu\text{L}$  DNase 底物工作溶液，然后加入 10  $\mu\text{L}$  DNase 标准品 (0.00000390625-0.00025 U/ $\mu\text{L}$  $\times$ 10  $\mu\text{L}$ /well = 0.0000390625-0.0025 U/well)，在 37 $^{\circ}\text{C}$  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。

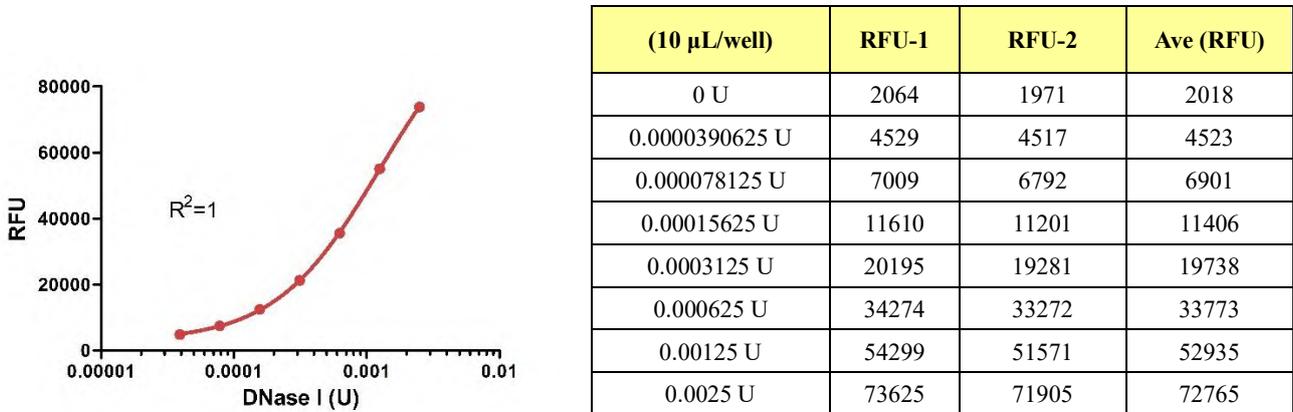


图 2 DNase I 标准曲线图

## 检测性能

### 灵敏度

检测线性区间 (U/ $\mu$ L/U/well)	定量下限 (LoQ*)
0.00000390625-0.00025 U/ $\mu$ L $\times$ 10 $\mu$ L/well = 0.0000390625-0.0025 U/well	0.0000390625 U
4.883 E-07 -3.125 E-05 U/ $\mu$ L $\times$ 80 $\mu$ L/well = 0.0000390625-0.0025 U/well	0.0000390625 U

### 批内差

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Number of Replicate	8	8	8	8	8	8	8
Mean RFU	2703	4170	6804	11847	19904	32163	45024
Standard Deviation	30	87	182	340	538	455	713
Coefficient of Variation (%)	1.1	2.1	2.7	2.9	2.7	1.4	1.6

### 批间差

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Number of Replicate	8	8	8	8	8	8	8
Mean RFU	2987	4711	8021	13914	23835	37728	51370
Standard Deviation	291	504	1025	1879	3323	5016	6482
Coefficient of Variation (%)	9.8	10.7	12.8	13.5	13.9	13.3	12.6

### 回收率

Sample	System	55 $\mu$ g/mL of Pyrophosphatase (n=2)		20 $\mu$ g/mL Thermostable Inorganic Pyrophosphatase (n=2)		10% of (50mM Tris-HCl and 50% Glycerol) (n=2)		1 $\times$ Reaction Buffer (n=2)	
		Calculated enzyme activity. (U)	Ave % RE	Calculated enzyme activity. (U)	Ave % RE	Calculated enzyme activity. (U)	Ave % RE	Calculated enzyme activity. (U)	Ave % RE
Sample 1	0.002	0.002132	107	0.00201	100	0.002013	101	0.002183	109
Sample 2	0.0005	0.000534	107	0.000491	98	0.000502	100	0.000565	113
Sample 3	0.0001	0.000110	110	0.000101	101	0.000105	105	0.000118	118

## 常见问题与解答

### 1. 本试剂盒除了可以检测 DNase I，还可以检测哪些酶？

本试剂盒除了可以检测 DNase I，也适用于 Exonuclease III, Bal31 nuclease, 微球菌核酸酶 (micrococcal nuclease), 全能核酸酶 (Benzonase nuclease), 绿豆核酸酶 (mung bean nuclease), S1 核酸酶 (S1 nuclease) 和 T7 endonuclease 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 DNase 活性的溶液	已知的抑制 DNase 活性的溶液如下： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 高离子浓度的溶液(例如：5 M NaCl, 20X SSC, 3 M 醋酸钠, 等.)</li> <li>• pH &lt;4 或 pH &gt;9 的溶液</li> <li>• 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)</li> </ul>
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 (DNase Substrate) 的溶液, 可能会导致测试出现假阳性信号。DNase Substrate 在以下类型的溶液中是不稳定的： <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH &gt;9 的溶液</li> <li>• 腐蚀性溶液 (强酸、强碱、漂白剂等)</li> </ul>

### 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  $\mu$ L 试剂盒自带的 DNase I 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。

### 4. 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。

### 5. 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 DNase 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。