

DNase 检测试剂盒(荧光探针法)盒操作手册

DNase 检测试剂盒基于荧光基团标记的 DNA 探针，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。当样本中不含 DNase 活性时，该探针稳定存在，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，不会产生荧光信号；当样本中含有 DNase 活性时，探针被降解，荧光报告基团和淬灭基团在溶液中的空间上发生分离，产生逐渐增强的荧光信号；荧光信号增加的速率与酶的数量和活性成正相关。

一. 主要组成成分及储存条件

名称	HBP002902 (192T)	HBP002903 (48T)	储存温度
10×反应液	2.0mL	0.5mL	-25~-15°C
DNA 探针	1 管	1 管	-25~-15°C
TE 缓冲液	2.0mL	0.5mL	-25~-15°C
DNase I 标准品 (2U/μL)	20μL	10μL	-25~-15°C
标准品稀释液	12mL	6mL	-25~-15°C
无 DNase 无 DNase 水	25mL	25mL	-25~30°C

二. 预期用途

可定量或定性检测单个环境，试剂或者耗材样品中的 DNase，判断样本是否被 DNase 污染。

三. 实验环境

1. 操作过程中需全程穿戴实验服，手套和口罩，严格控制 DNase 污染；
2. 为了防止操作过程中引入外源的 DNase，前期加样请在超净工作台中进行，实验前用核酸酶清除剂清洁超净工作台中的操作表面，并打开超清洁工作平台紫外照射 30 分钟；
3. 其他工作区域在整个实验开始前，也先使用核酸酶清除剂对实验环境进行处理。

四. 客户自备

	耗材	仪器
1	2.5μL 移液器	涡旋仪
2	10μL 移液器	桌面离心机
3	100μL 移液器	qPCR 仪/酶标仪
4	200μL 移液器	
5	DNase DNase free 枪头	
6	200μL EP 管	
7	2ml 棕色 EP 管	
8	黑色平底酶标板/PCR96 孔板 (高管)	

9	核酸酶清除剂
10	无酶水
11	离心管架

本实验操作根据酶标仪增益功能不同，分为 3 种类型进行详细说明，用户可根据自己酶标仪的具体功能，选择对应的实验操作方法。

1. 具备自动优化+手动设置增益值的酶标仪，以下以 Tecan Spark 为例；
2. 只能选择自动优化或者高中低增益值的酶标仪，以下以 SpectraMax iD5 为例；
3. 对于不具备自动优化的酶标仪，比如 Fluoroskan FL，这种酶标仪不推荐使用，此时建议使用具有 FAM 通道的 qPCR 仪，以下以 Thermofisher 7500 为例。

五. 实验操作

1 具备自动优化+手动设置增益值的酶标仪，以 Tecan Spark 为例

1.1 取出试剂盒中 10×反应液、TE 缓冲液、DNase I 标准品 (2U/μL)、标准品稀释液和无 DNase 无 DNase 水，平衡至室温 (18°C~25°C)，确保所有液体组分都彻底解冻。将各个组分使用涡旋混合器充分振荡混匀，然后使用桌面离心机瞬时离心 (4000~7000rpm 离心 10 秒)。

1.2 取出 DNA 探针，使用桌面离心机 4000~7000rpm 离心 60 秒，使之聚集至管底，小心开启管盖，加入 40μL TE 缓冲液溶解为探针储存液根据单次使用量进行分装后于 -25~-15°C 储存，避免反复冻融。每次使用时取出探针储存液，稀释 50 倍 (如 10μL DNA 探针加入 490μL TE 缓冲液)，作为 DNA 探针工作溶液，未使用完的 DNA 探针工作溶液于 -25~-15°C 储存，避免反复冻融。

1.3 对于具备自动优化+手动设置增益值的酶标仪，首次实验时需要得到具体合适的 gain 值，以避免灵敏度下降或信号过饱和的风险。按照以下体系配制阴性对照和阳性对照的体系：

	阳性对照体系 (μL)	阴性对照体系 (μL)
无 DNase 无 DNase 水	79	80
DNA 探针工作溶液	10	10
10μL 10×反应液	10	10
DNase I 标准品 (2U/μL)	1	0
总体积	100	100

注意：加入探针和反应液时请分别在同一个孔的不同侧加入，避免过早反应。

1.4 37°C 避光放置 30min，可以用锡箔纸包起来再放在恒温培养箱内。

1.5 按照以下参数进行仪器设置，并进行 30min 检测读数，此时，在数据文件中的仪器参数栏会显示

增益值 (Gain) , 记为 G1。

荧光检测模块; 温度 37°C; 检测前振板 10~15s; 激发波长 λ_{Ex} =485 nm; 发射波长 λ_{Em} = 525 nm;

终点模式

注意: 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。

1.6 根据需要进行定量或者定性检测

1.6.1 定量检测

1.6.1.1 稀释标准品, 取 11 管 1.5ml DNase Free 的 EP 管, 按下表进行编号, 将 DNase I 标准品(2U/ μ L), 用标准品稀释液按下表稀释:

编号	配制过程	浓度
1	2 μ L 标准品原液+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-2} U/ μ L
2	2 μ L 编号 1 样本+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-4} U/ μ L
3	100 μ L 编号 2 样本+100 μ L 标准品稀释液	1×10^{-4} U/ μ L
4	100 μ L 编号 3 样本+100 μ L 标准品稀释液	5×10^{-5} U/ μ L
5	100 μ L 编号 4 样本+100 μ L 标准品稀释液	2.5×10^{-5} U/ μ L
6	100 μ L 编号 5 样本+100 μ L 标准品稀释液	1.25×10^{-5} U/ μ L

再将编号 3~6 样本用无 DNase 无 DNase 水稀释 10 倍:

7	20 μ L 编号 3 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	1×10^{-5} U/ μ L
8	20 μ L 编号 4 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	5×10^{-6} U/ μ L
9	20 μ L 编号 5 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	2.5×10^{-6} U/ μ L
10	20 μ L 编号 6 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	1.25×10^{-6} U/ μ L

编号 7~10 样本作为标准品; 编号 11, 无 DNase 无 DNase 水作为 0 浓度样本。

注意:

- ✓ 由于配制过程标准品取样较少, 尽量选用精密度高取样准确的量程接近的移液枪, 确保取样准确。
- ✓ 取 11 个 1.5ml DNase Free 的 EP 管, 编上相应编号, 先加体积大的稀释液或无酶水, 再加体积小的标准品原液或具体样本。
- ✓ 每个编号样本配制好之后用涡旋仪振荡混匀。

1.6.1.2 配制标准品和待测样本反应体系, 在 96 孔黑色酶标板分别加入标准品和待测样本, 每种样本 2 个复孔, 具体体系如下:

标准品/待测样本反应体系	体积 (μ L)
标准品/待测样本	80
DNA 探针工作溶液	10

10×反应液	10
总体积	100

注意：加样时避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡，如果产生气泡，可以用移液器吹打或用较细的吸头戳破气泡。

1.6.1.3 用 Tecan 酶标仪进行检测，PMT Gain 选择前面设置好的 G1。

荧光检测模块；温度 37°C；检测前振板 10~15s；动力学曲线；设置荧光读数参数为：以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中培养板 30min，可读取 0~30min 所有荧光信号，以收集实时数据；激发波长 λ_{Ex} = 485 nm；发射波长 λ_{Em} = 525 nm

1.6.1.4 将 0 浓度样本、标准品及待测样本，按检测步骤一同测试，得到 RFU0、RFU30；计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$ ，将 ΔRFU (0 浓度)、 ΔRFU (标准品)为纵坐标，标准品 DNase I 浓度为横坐标(0 浓度为 0)，进行线性拟合，求出拟合方程 $y = ax + b$ ，相关性系数 r 要 ≥ 0.99 ，将 ΔRFU (污染样本)作为 y 带入方程，求出 x ，乘以样本预稀释倍数后，为样本的大致浓度值。

注：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。

1.6.2 定性检测

1.6.2.1 DNase I 标准品 (2U/ μ L)，用标准品稀释液按下表稀释，配制阳性/阴性对照：

编号	配制过程	浓度
1	2 μ L 标准品原液+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-2} U/ μ L
2	2 μ L 编号 1 样本+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-4} U/ μ L
3	20 μ L 编号 2 样本+180 μ L 标准品稀释液	2×10^{-5} U/ μ L

编号 3 样本作为阳性对照；编号 4，无 DNase 无 DNase 水作为阴性对照。

注意：

- ✓ 由于配制过程标准品取样较少，尽量选用精密度高取样准确的量程接近的移液枪，确保取样准确。
- ✓ 取 4 个 1.5ml DNase Free 的 EP 管，编上相应编号，先加体积大的稀释液或无酶水，再加体积小的标准品原液或具体样本。
- ✓ 每个编号样本配制好之后用涡旋仪振荡混匀。

1.6.2.2 在 96 孔黑色酶标板上选择 4 个孔，分别加入阴性对照，阳性对照，其余孔加入待测样本，每种样本 2 个复孔，配制待测样本反应体系，具体体系如下：

对照/待测样本反应体系	体积 (μ L)
对照/待测样本	80
DNA 探针工作溶液	10
10×反应液	10

总体积 100

注意：加样时避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡，如果产生气泡，可以用移液器吹打或用较细的吸头戳破气泡。

1.6.2.3 用 Tecan 酶标仪进行检测，PMT Gain 选择前面设置好的 G1。

荧光检测模块；温度 37°C；检测前振板 10~15s；动力学曲线；设置荧光读数参数为：以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中孵育板 30min，可读取 0~30min 所有荧光信号，以收集实时数据；激发波长 λ_{Ex} = 485nm；发射波长 λ_{Em} = 525 nm。

1.6.2.4 先确定阴性对照荧光值孵育 30min 后变化不超过 50%，且阳性对照 RFU30 远大于 2RFU₀。计算 RFU30/RFU₀ 结果，此时待测样本 RFU30 \geq 2RFU₀，则判定待测样本被 DNase 污染。

注意：

- ✓ 若待测样本中含有影响荧光基团发光的物质（如深色溶液，高浓度的黏性物质或表面活性剂），应使用无 DNase 无 DNase 水稀释样本，但请注意稀释操作会影响灵敏度；
- ✓ 试剂盒中标准品为 DNase I，其活性单位定义为：在 DNase I 反应缓冲液中，37°C 条件下 10 分钟内能够完全降解 1 μ g pBR322 DNA 所需的酶量，一个 DNase I 活性单位相当于 0.3 Kunitz 单位；
- ✓ 若待测样本严重污染或含有干扰物质时，可能会出现 RFU0（待测样本）> RFU0（阳性质控），且 RFU30（待测样本）< 2 \times RFU0（待测样本），导致假阴性判断，此时应将待测样本用无 DNase 无 DNase 水进行预稀释，再进行检测。

1. 对于只能选择自动优化或者高中低增益值的酶标仪，以 SpectraMax iD5 为例

1.1 取出试剂盒中 10 \times 反应液、TE 缓冲液、DNase I 标准品（2U/ μ L）、标准品稀释液和无 DNase 无 DNase 水，平衡至室温（18°C~25°C），确保所有液体组分都彻底解冻。将各个组分使用涡旋混合器充分振荡混匀，然后使用桌面离心机瞬时离心（4000~7000rpm 离心 10 秒）。

1.2 取出 DNA 探针，使用桌面离心机 4000~7000rpm 离心 60 秒，使之聚集至管底，小心开启管盖，加入 40 μ L TE 缓冲液溶解为探针储存液根据单次使用量进行分装后于 -25~-15°C 储存，避免反复冻融。每次使用时取出探针储存液，稀释 50 倍（如 10 μ L DNA 探针加入 490 μ L TE 缓冲液），作为 DNA 探针工作溶液，未使用完的 DNA 探针工作溶液于 -25~-15°C 储存，避免反复冻融。

2.3 根据需要进行定量或者定性检测

2.3.1 定量检测

2.3.1.1 稀释标准品，取 11 管 1.5ml DNase Free 的 EP 管，按下表进行编号，将 DNase I 标准品(2U/ μ L)，用标准品稀释液按下表稀释：

编号	配制过程	浓度
1	2 μ L 标准品原液+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-2} U/ μ L
2	2 μ L 编号 1 样本+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-4} U/ μ L
3	100 μ L 编号 2 样本+100 μ L 标准品稀释液	1×10^{-4} U/ μ L
4	100 μ L 编号 3 样本+100 μ L 标准品稀释液	5×10^{-5} U/ μ L
5	100 μ L 编号 4 样本+100 μ L 标准品稀释液	2.5×10^{-5} U/ μ L
6	100 μ L 编号 5 样本+100 μ L 标准品稀释液	1.25×10^{-5} U/ μ L

再将编号 3~6 样本用无 DNase 无 DNase 水稀释 10 倍：

7	20 μ L 编号 3 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	1×10^{-5} U/ μ L
8	20 μ L 编号 4 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	5×10^{-6} U/ μ L
9	20 μ L 编号 5 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	2.5×10^{-6} U/ μ L
10	20 μ L 编号 6 样本+180 μ L 无 DNase 无 DNase 水	1.25×10^{-6} U/ μ L

编号 7~10 样本作为标准品；编号 11，无 DNase 无 DNase 水作为 0 浓度样本。

注意：

- ✓ 由于配制过程标准品取样较少，尽量选用精密度高取样准确的量程接近的移液枪，确保取样准确；
- ✓ 取 11 个 1.5ml DNase Free 的 EP 管，编上相应编号，先加体积大的稀释液或无酶水，再加体积小的标准品原液或具体样本；
- ✓ 每个编号样本配制好之后用涡旋仪振荡混匀。

2.3.1.2 配制标准品和待测样本反应体系，在 96 孔黑色酶标板分别加入标准品和待测样本，每种样本 2 个复孔，具体体系如下：

标准品/待测样本反应体系	体积 (μ L)
标准品/待测样本	80
DNA 探针工作溶液	10
10 \times 反应液	10
总体积	100

注意：加样时避免加在孔壁上部，加样时注意不可溅出，不可产生气泡，如果产生气泡，可以用移液器吹打或用较细的吸头戳破气泡。

2.3.1.3 用 iD5 酶标仪进行检测，[PMT Gain 选择中。](#)

荧光检测模块；温度 37°C；检测前振板 10~15s；动力学曲线；设置荧光读数参数为：以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中孵育板 30min，可读取 0~30min 所有荧光信号，以收集实时数据；激发波长 λ_{Ex} = 485 nm；发射波长 λ_{Em} = 525 nm。

2.3.1.4 将 0 浓度样本、标准品及待测样本，按检测步骤一同测试，得到 RFU0、RFU30；计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$ ，将 ΔRFU (0 浓度)、 ΔRFU (标准品)为纵坐标，标准品 DNase I 浓度为横坐标(0 浓度为 0)，进行线性拟合，求出拟合方程 $y = ax + b$ ，相关性系数 r 要 ≥ 0.99 ，将 ΔRFU (污染样本)作为 y 带入方程，求出 x ，乘以样本预稀释倍数后，为样本的大致浓度值。

注：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。

2.3.2 定性检测

2.3.2.1 DNase I 标准品 (2U/ μ L)，用标准品稀释液按下表稀释，配制阳性/阴性对照：

编号	配制过程	浓度
1	2 μ L 标准品原液+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-2} U/ μ L
2	2 μ L 编号 1 样本+198 μ L 标准品稀释液	2×10^{-4} U/ μ L
3	20 μ L 编号 2 样本+180 μ L 标准品稀释液	2×10^{-5} U/ μ L

编号 3 样本作为阳性对照，编号 4，无 DNase 无 DNase 水作为阴性对照。

注意：

- ✓ 由于配制过程标准品取样较少，尽量选用精密度高取样准确的量程接近的移液枪，确保取样准确；
- ✓ 取 4 个 1.5ml DNase Free 的 EP 管，编上相应编号，先加体积大的稀释液或无酶水，再加体积小的标准品原液或具体样本；
- ✓ 每个编号样本配制好之后用涡旋仪振荡混匀。

2.3.2.2 在 96 孔黑色酶标板上选择 4 个孔，分别加入阴性对照，阳性对照，其余孔加入待测样本，每种样本 2 个复孔，配制待测样本反应体系，具体体系如下：

对照/待测样本反应体系	体积 (μ L)
对照/待测样本	80
DNA 探针工作溶液	10
10 \times 反应液	10
总体积	100

注意：加样时避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡，如果产生气泡，可以用移液器吹打或用较细的吸头戳破气泡。

2.3.2.3 用 iD5 酶标仪进行检测，[PMT Gain 选择中。](#)

荧光检测模块；温度 37°C；检测前振板 10~15s；动力学曲线；设置荧光读数参数为：以 1~1.5 min 的间隔在荧光计中孵育板 30min，可读取 0~30min 所有荧光信号，以收集实时数据；激发波长 $\lambda_{Ex} = 485\text{nm}$ ；发射波长 $\lambda_{Em} = 525\text{nm}$ 。

2.3.2.4 先确定阴性对照荧光值孵育 30min 后变化不超过 50%，且阳性对照 RFU30 远大于 2RFU_0 。计算 $\text{RFU}_{30}/\text{RFU}_0$ 结果，此时待测样本 $\text{RFU}_{30} \geq 2\text{RFU}_0$ ，则判定待测样本被 DNase 污染。

注意：

- ✓ 若待测样本中含有影响荧光基团发光的物质（如深色溶液，高浓度的黏性物质或表面活性剂），应使用无 DNase 无 DNase 水稀释样本，但请注意稀释操作会影响灵敏度；
- ✓ 试剂盒中标准品为 DNase I，其活性单位定义为：在 DNase I 反应缓冲液中，37°C 条件下 10 分钟内能够完全降解 $1\mu\text{g}$ pBR322 DNA 所需的酶量，一个 DNase I 活性单位相当于 0.3 Kunitz 单位；
- ✓ 若待测样本严重污染或含有干扰物质时，可能会出现 RFU_0 （待测样本） $>$ RFU_0 （阳性质控），且 RFU_{30} （待测样本） $<$ $2 \times \text{RFU}_0$ （待测样本），导致假阴性判断，此时应将待测样本用无 DNase 无 DNase 水进行预稀释，再进行检测。

3 对于不具备自动优化的酶标仪，比如 Fluoroskan FL，这种酶标仪不推荐使用，此时建议使用具有 FAM 通道的 qPCR 仪，以 Thermofisher 7500 为例，该方法只适用于定量检测。

3.1 取出试剂盒中 10×反应液、TE 缓冲液、DNase I 标准品（ $2\text{U}/\mu\text{L}$ ）、标准品稀释液和无 DNase 无 DNase 水，平衡至室温（ $18^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ ），确保所有液体组分都彻底解冻。将各个组分使用涡旋混合器充分振荡混匀，然后使用桌面离心机瞬时离心（ $4000 \sim 7000\text{rpm}$ 离心 10 秒）。

3.2 取出 DNA 探针，使用桌面离心机 $4000 \sim 7000\text{rpm}$ 离心 60 秒，使之聚集至管底，小心开启管盖，加入 $40\mu\text{L}$ TE 缓冲液溶解为探针储存液根据单次使用量进行分装后于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 储存，避免反复冻融。每次使用时取出探针储存液，稀释 50 倍（如 $10\mu\text{L}$ DNA 探针加入 $490\mu\text{L}$ TE 缓冲液），作为 DNA 探针工作溶液，未使用完的 DNA 探针工作溶液于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 储存，避免反复冻融。

3.3 稀释标准品，取 11 管 1.5ml DNase Free 的 EP 管，按下表进行编号，将 DNase I 标准品（ $2\text{U}/\mu\text{L}$ ），用标准品稀释液按下表稀释：

编号	配制过程	浓度
1	$2\mu\text{L}$ 标准品原液 + $198\mu\text{L}$ 标准品稀释液	$2 \times 10^{-2}\text{U}/\mu\text{L}$
2	$2\mu\text{L}$ 编号 1 样本 + $198\mu\text{L}$ 标准品稀释液	$2 \times 10^{-4}\text{U}/\mu\text{L}$
3	$100\mu\text{L}$ 编号 2 样本 + $100\mu\text{L}$ 标准品稀释液	$1 \times 10^{-4}\text{U}/\mu\text{L}$

4	100μL	编号 3 样本+100μL	标准品稀释液	$5 \times 10^{-5} \text{U}/\mu\text{L}$
5	100μL	编号 4 样本+100μL	标准品稀释液	$2.5 \times 10^{-5} \text{U}/\mu\text{L}$
6	100μL	编号 5 样本+100μL	标准品稀释液	$1.25 \times 10^{-5} \text{U}/\mu\text{L}$

再将编号 3~6 样本用无 DNase 无 DNase 水稀释 10 倍:

7	20μL	编号 3 样本+180μL	无 DNase 无 DNase 水	$1 \times 10^{-5} \text{U}/\mu\text{L}$
8	20μL	编号 4 样本+180μL	无 DNase 无 DNase 水	$5 \times 10^{-6} \text{U}/\mu\text{L}$
9	20μL	编号 5 样本+180μL	无 DNase 无 DNase 水	$2.5 \times 10^{-6} \text{U}/\mu\text{L}$
10	20μL	编号 6 样本+180μL	无 DNase 无 DNase 水	$1.25 \times 10^{-6} \text{U}/\mu\text{L}$

编号 7~10 样本作为标准品; 编号 11, 无 DNase 无 DNase 水作为 0 浓度样本。

注意:

- ✓ 由于配制过程标准品取样较少, 尽量选用精密度高取样准确的量程接近的移液枪, 确保取样准确;
- ✓ 取 11 个 1.5ml DNase Free 的 EP 管, 编上相应编号, 先加体积大的稀释液或无酶水, 再加体积小的标准品原液或具体样本;
- ✓ 每个编号样本配制好之后用涡旋仪振荡混匀。

3.4 配制标准品和待测样本反应体系, 在 96 孔黑色酶标板分别加入标准品和待测样本, 每种样本 2 个复孔, 具体体系如下:

标准品/待测样本反应体系	体积 (μL)
标准品/待测样本	80
DNA 探针工作溶液	10
10×反应液	10
总体积	100

注意: 加样时避免加在孔壁上, 加样时注意不可溅出, 不可产生气泡, 如果产生气泡, 可以用移液器吹打或用较细的吸头戳破气泡。

3.5 [荧光定量 PCR 仪参数设置为 FAM 通道; 反应程序 37°C, 1min \(读取荧光\), 30 个循环; 反应体积 100μL。使用原始荧光曲线数据, 即 Raw Data, FAM 为第一通道, 进行计算, 第 1 个循环作为 RFU0, 第 30 个循环作为 RFU30。](#)

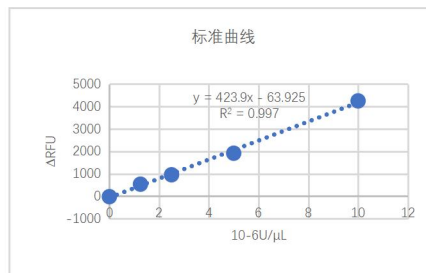
3.6 将 0 浓度样本、标准品及待测样本, 按检测步骤一同测试, 得到 RFU0、RFU30; 计算 $\Delta \text{RFU} = \text{RFU}_{30} - \text{RFU}_0$, 将 ΔRFU (0 浓度)、 ΔRFU (标准品) 为纵坐标, 标准品 DNase I 浓度为横坐标 (0 浓度为 0), 进行线性拟合, 求出拟合方程 $y = ax + b$, 相关性系数 r 要 ≥ 0.99 , 将 ΔRFU (污染样本) 作为 y 代入方程, 求出 x , 乘以样本预稀释倍数后, 为样本的大致浓度值。

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

六. 结果分析

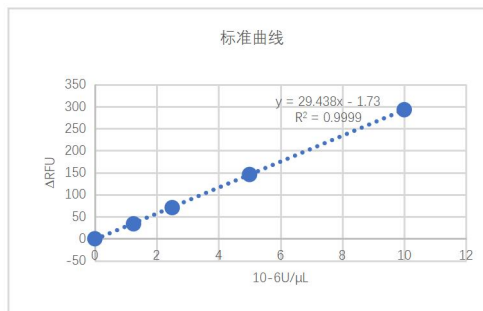
1. 酶标仪结果(以 Tecan Spark 为例)

Cycle Nr.	Time [s]	Temp. [°C]	水	1.25x10 ⁻⁶ U/μL	2.5x10 ⁻⁶ U/μL	5x10 ⁻⁶ U/μL	1x10 ⁻⁵ U/μL	标准曲线						
								10 ⁻⁶ U/μL	ΔRFU					
1	0	36.7	374	392	423	436	420	421	445	470	550	585		
2	89.819	37.2	371	384	436	458	462	460	520	542	707	745		
3	179.833	37	366	388	459	482	502	504	594	617	886	921		
4	269.845	36.8	365	381	476	501	545	541	673	701	1052	1110		
5	359.843	36.8	363	380	506	524	589	591	765	787	1258	1324		
6	449.836	36.7	361	387	532	549	631	635	861	874	1466	1524		
7	539.842	36.7	364	380	553	573	667	674	959	970	1678	1748		
8	629.845	36.7	357	371	572	596	721	720	1044	1053	1872	1972		
9	719.854	36.7	358	379	599	629	766	763	1144	1151	2093	2186		
10	809.849	36.8	356	379	627	655	834	819	1252	1254	2302	2420		
11	899.848	36.8	358	373	663	686	878	865	1339	1350	2537	2641		
12	989.862	36.8	363	371	692	713	926	921	1456	1445	2724	2868		
13	1079.865	36.8	353	379	712	741	967	955	1551	1543	2939	3119		
14	1169.862	36.8	355	375	739	781	1029	1023	1666	1640	3200	3338		
15	1259.861	36.8	354	369	777	801	1072	1052	1762	1754	3425	3542		
16	1349.866	36.8	355	372	797	833	1124	1110	1862	1861	3620	3764		
17	1439.86	36.9	356	367	841	868	1179	1166	1974	1966	3870	4010		
18	1529.868	36.9	354	374	852	893	1239	1224	2052	2051	4075	4237		
19	1619.87	36.9	353	372	885	928	1281	1245	2159	2156	4282	4488		
20	1709.873	36.9	353	374	918	952	1341	1313	2290	2278	4499	4623		
21	1799.884	36.9	354	368	941	987	1389	1360	2375	2369	4719	4911		
30min/0min			0.9	0.9	2.2	2.3	3.3	3.2	5.3	5.0	8.6	8.4	标准曲线	
均值			0.9		2.25		3.27		5.19		8.50		0	-22
定性			无污染		有污染		有污染		有污染		有污染		1.25	534.5
30min-0min			-20.0	-24.0	518	551	969.0	939.0	1930.0	1899.0	4169.0	4326.0	2.5	954
均值			-22.0		534.50		954.00		1914.50		4247.50		5	1914.5
													10	4247.5



2. qPCR 结果 (以宏石为例)

Cycle Nr.	Time [s]	Temp. [°C]	水	1.25x10 ⁻⁶ U/μL	2.5x10 ⁻⁶ U/μL	5x10 ⁻⁶ U/μL	1x10 ⁻⁵ U/μL	标准曲线						
								10 ⁻⁶ U/μL	ΔRFU					
1	0min	36.8	47.73	51.06	52.24	51.66	57.01	57.20	68.00	68.90	92.72	96.64		
2	30min	37.5	47.47	51.24	86.82	84.83	125.60	129.89	217.00	211.57	374.58	400.62		
30min-0min			-0.26	0.18	34.59	33.17	68.59	72.70	149.00	142.68	281.86	303.98	标准曲线	
均值			0.04		33.88		70.64		145.84		292.92		0	0.04
													1.25	33.88
													2.5	70.64
													5	145.84
													10	292.92



七. 常见问题与解答

Q1 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 II, 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。

Q2 本试剂盒适合什么应用场景？

- 1) DNA 或 mRNA 药物/疫苗中试及生产过程中环境控制；
- 2) 耗材、试剂、填料厂家产品生产质量控制与放行；
- 3) 疫苗、抗体、基因治疗等生物制品中间产物（原液或半成品）工艺杂质残留检测。

Q3 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。

Q4 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探针有降解作用，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。

Q5 试剂盒反复冻融会不会有影响？

最好避免反复冻融，探针可以以高浓度储存液分装储存，每次取单独分装好的储存液稀释成工作液模式。目前检测结果，试剂盒冻融 6 次不影响测试结果。

Q6 DNase DNase 两种酶的检测试剂盒都有提到增益值，增益值 Gain 的计算方式是什么？

另外，设置增益值的目的是？

Gain 值就是增益，简而言之就是放大倍数，表示检测器 PMT 的电压，Gain 越大，信号值越大，但噪音也会增加。

Q7 试剂盒操作时需要注意什么？

试剂盒操作时要严格避免外源 DNase/DNase 的污染，实验用耗材使用 DNase-free 的耗材，操作台面使用前应用 DNase/DNase 清除剂擦拭，5 分钟后用洁净纸巾擦拭干净即可进行后续的实验操作。实验前确定检测酶标仪是否带有增益功能，没有增益功能可用 qPCR 仪器替代。加样操作应尽量快，时间过长会影响实验准确性。