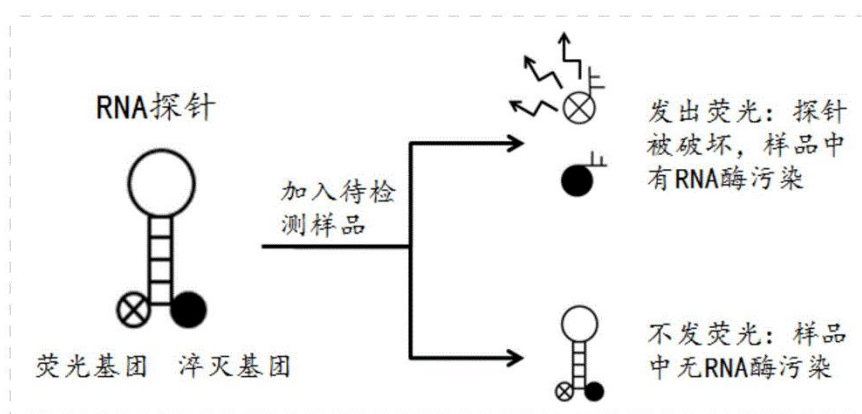


## RNase 检测试剂盒(荧光探针法)盒操作手册

RNase 检测试剂盒基于荧光基团标记的 RNA 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 RNase 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 RNase 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	HBP003002 (192T)	HBP003003 (48T)	储存温度
10×反应液	2.0mL	0.5mL	-25~-15℃
RNA 探针	1 管	1 管	-25~-15℃
TE 缓冲液	2.0mL	0.5mL	-25~-15℃
RNase A 标准品 (10mg/mL)	20μL	10μL	-25~-15℃
标准品稀释液	12mL	6mL	-25~-15℃
无 DNase 无 RNase 水	25mL	25mL	-25~30℃

### 二. 预期用途

可定量或定性检测环境，试剂，耗材等样品中的 RNase，判断样本是否被 RNase 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 RNase 污染；
2. 为了防止操作过程中引入外源的 RNase，前期加样请在超净工作台中进行，实验前用 RNase 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	2.5 $\mu$ L 移液器	涡旋仪
2	10 $\mu$ L 移液器	桌面离心机
3	100 $\mu$ L 移液器	qPCR 仪/酶标仪
4	200 $\mu$ L 移液器	
5	RNase DNase free 枪头	
6	200 $\mu$ L 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 Vic 或 Hex 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 $\times$ 反应液、TE 缓冲液、RNase A 标准品 (10mg/mL)、标准品稀释液和无 DNase 无 RNase 水，平衡至室温 (18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ 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 RNA 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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ L RNA 探针加入 490 $\mu$ L TE 缓冲液)，作为 RNA 探针工作溶液，未使用完的 RNA 探针工作溶液于 -25~-15 $^{\circ}$ 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 RNase 水	79	80
RNA 探针工作溶液	10	10
10μL 10×反应液	10	10
RNase A 标准品 (10mg/mL)	1	0
<b>总体积</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

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λEx = 535 nm/发射波长λEm = 575 nm/终点模式

## 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 14 管 1.5ml RNase Free 的 EP 管，按下表进行编号，将 RNase A 标准品 (10mg/mL)，用标准品稀释液按下表稀释：

编号	配制过程	浓度
1	2μL 标准品原液+198μL 标准品稀释液	0.1mg/mL
2	2μL 编号 1 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-3}$ mg/mL
3	2μL 编号 2 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-5}$ mg/mL
4	2μL 编号 3 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-7}$ mg/mL
5	100μL 编号 4 样本+100μL 标准品稀释液	$5 \times 10^{-9}$ mg/mL
6	100μL 编号 5 样本+100μL 标准品稀释液	$2.5 \times 10^{-8}$ mg/mL
7	100μL 编号 6 样本+100μL 标准品稀释液	$1.25 \times 10^{-8}$ mg/mL
8	100μL 编号 7 样本+100μL 标准品稀释液	$6.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
9	100μL 编号 8 样本+100μL 标准品稀释液	$3.125 \times 10^{-9}$ mg/mL

再将编号 6~9 样本用无 DNase 无 RNase 水稀释 10 倍：

10	20μL 编号 6 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$2.5 \times 10^{-9}$ mg/mL
11	20μL 编号 7 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$1.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
12	20μL 编号 8 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$6.25 \times 10^{-10}$ mg/mL
13	20μL 编号 9 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$3.13 \times 10^{-10}$ mg/mL

编号 10~13 样本作为标准品；编号 14，无 DNase 无 RNase 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 14 个 1.5ml RNase 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 (μL)
标准品/待测样本	80
RNA 探针工作溶液	10
10×反应液	10
<b>总体积</b>	<b>100</b>

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λEx = 535 nm /发射波长λEm = 575 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  $\Delta RFU = RFU30 - RFU0$ ，将  $\Delta RFU(0 \text{ 浓度})$ 、 $\Delta RFU(\text{标准品})$  为纵坐标，标准品 RNase A 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  $\geq 0.99$ ，将  $\Delta RFU(\text{污染样本})$  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 RNase A 标准品 (10mg/mL)，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	2μL 标准品原液+198μL 标准品稀释液	0.1mg/mL
2	2μL 编号 1 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-3}$ mg/mL
3	2μL 编号 2 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-5}$ mg/mL
4	2μL 编号 3 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-7}$ mg/mL
5	100μL 编号 4 样本+100μL 标准品稀释液	$5 \times 10^{-8}$ mg/mL

6                      20 $\mu$ L 编号 5 样本+180 $\mu$ L 无 DNase 无 RNase 水                      5 $\times 10^{-9}$ mg/mL

编号 6 样本 (5pg/mL, 约  $2.5 \times 10^{-8}$ U/ $\mu$ L) 作为阳性对照。

编号 7, 无 DNase 无 RNase 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 7 个 1.5ml RNase 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 ( $\mu$ L)
对照/待测样本	80
RNA 探针工作溶液	10
10 $\times$ 反应液	10
<b>总体积</b>	<b>100</b>

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 $^{\circ}$ 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 $\lambda_{Ex} = 535$  nm/发射波长 $\lambda_{Em} = 575$  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 RFU<sub>30</sub> 远大于 2RFU<sub>0</sub>。计算 RFU<sub>30</sub>/RFU<sub>0</sub> 结果，此时待测样本 RFU<sub>30</sub>  $\geq$  2RFU<sub>0</sub>，则判定待测样本被 RNase 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 RNase 水稀释样本,但请注意稀释操作会影响灵敏度;
- ✓ 若待测样本中含 RNA 酶活性抑制剂(如高离子强度溶液、pH<4 或 pH>9 的缓冲液、蛋白变性剂等),则测定结果为样本溶液的整体酶活性,而不是样本溶液中酶的单独活性;
- ✓ 若待测样本严重污染或含有干扰物质时,可能会出现 RFU<sub>0</sub>(待测样本) > RFU<sub>0</sub>(阳性质控),且 RFU<sub>30</sub>(待测样本) < 2 $\times$ RFU<sub>0</sub>(待测样本),导致假阴性判断,此时应将待测样本用无 DNase 无 RNase 水进行预稀释,再进行检测。

## 2. 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

2.1 取出试剂盒中 10×反应液、TE 缓冲液、RNase A 标准品 (10mg/mL)、标准品稀释液和无 DNase 无 RNase 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)。

2.2 取出 RNA 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 10μLRNA 探针加入 490μL TE 缓冲液)，作为 RNA 探针工作溶液，未使用完的 RNA 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 14 管 1.5ml RNase Free 的 EP 管，按下表进行编号，将 RNase A 标准品(10mg/mL)，用标准品稀释液按下表稀释：

编号	配制过程	浓度
1	2μL 标准品原液+198μL 标准品稀释液	0.1mg/mL
2	2μL 编号 1 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-3}$ mg/mL
3	2μL 编号 2 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-5}$ mg/mL
4	2μL 编号 3 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-7}$ mg/mL
5	100μL 编号 4 样本+100μL 标准品稀释液	$5 \times 10^{-8}$ mg/mL
6	100μL 编号 5 样本+100μL 标准品稀释液	$2.5 \times 10^{-8}$ mg/mL
7	100μL 编号 6 样本+100μL 标准品稀释液	$1.25 \times 10^{-8}$ mg/mL
8	100μL 编号 7 样本+100μL 标准品稀释液	$6.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
9	100μL 编号 8 样本+100μL 标准品稀释液	$3.125 \times 10^{-9}$ mg/mL

再将编号 6~9 样本用无 DNase 无 RNase 水稀释 10 倍：

10	20μL 编号 6 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$2.5 \times 10^{-9}$ mg/mL
11	20μL 编号 7 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$1.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
12	20μL 编号 8 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$6.25 \times 10^{-10}$ mg/mL
13	20μL 编号 9 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$3.13 \times 10^{-10}$ mg/mL

编号 10~13 样本作为标准品；编号 14，无 DNase 无 RNase 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 14 个 1.5ml RNase 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 (μL)
标准品/待测样本	80
RNA 探针工作溶液	10
10×反应液	10
<b>总体积</b>	<b>100</b>

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。

2.3.1.3 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 $\lambda_{Ex} = 535$  nm /发射波长 $\lambda_{Em} = 575$  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 RFU<sub>0</sub>、RFU<sub>30</sub>；计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$ ，将 $\Delta RFU$ (0 浓度)、 $\Delta RFU$ (标准品)为纵坐标，标准品 RNase A 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  $\geq 0.99$ ，将 $\Delta RFU$ (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 $\Delta RFU < 0$ 的情况，此时按 $\Delta RFU = 0$ 计算。

### 2.3.2 定性检测

2.3.2.1 RNase A 标准品 (10mg/mL)，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	2μL 标准品原液+198μL 标准品稀释液	0.1mg/mL
2	2μL 编号 1 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-3}$ mg/mL
3	2μL 编号 2 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-5}$ mg/mL
4	2μL 编号 3 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-7}$ mg/mL
5	100μL 编号 4 样本+100μL 标准品稀释液	$5 \times 10^{-8}$ mg/mL
6	20μL 编号 5 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$5 \times 10^{-9}$ mg/mL

编号 6 样本 (5pg/mL, 约  $2.5 \times 10^{-8}$ U/μL) 作为阳性对照。

编号 7, 无 DNase 无 RNase 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 7 个 1.5ml RNase 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 ( $\mu\text{L}$ )
对照/待测样本	80
RNA 探针工作溶液	10
10 $\times$ 反应液	10
<b>总体积</b>	<b>100</b>

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 $^{\circ}\text{C}$  /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 $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$  /发射波长 $\lambda_{\text{Em}} = 575 \text{ nm}$ 。

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 RFU<sub>30</sub> 远大于 2RFU<sub>0</sub>。计算 RFU<sub>30</sub>/RFU<sub>0</sub> 结果，此时待测样本 RFU<sub>30</sub>  $\geq$  2RFU<sub>0</sub>，则判定待测样本被 RNase 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 RNase 水稀释样本，但请注意稀释操作会影响灵敏度；
- ✓ 若待测样本中含 RNA 酶活性抑制剂（如高离子强度溶液、pH<4 或 pH>9 的缓冲液、蛋白变性剂等），则测定结果为样本溶液的整体酶活性，而不是样本溶液中酶的单独活性；
- ✓ 若待测样本严重污染或含有干扰物质时，可能会出现 RFU<sub>0</sub>（待测样本）>RFU<sub>0</sub>（阳性质控），且 RFU<sub>30</sub>（待测样本）<2 $\times$ RFU<sub>0</sub>（待测样本），导致假阴性判断，此时应将待测样本用无 DNase 无 RNase 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 *Vic* 或 *Hex* 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、RNase A 标准品 (10mg/mL)、标准品稀释液和无 DNase 无 RNase 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)。

3.2 取出 RNA 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 RNA 探针加入 490μL TE 缓冲液)，作为 RNA 探针工作溶液，未使用完的 RNA 探针工作溶液于 -25~-15°C 储存，避免反复冻融。

3.3 稀释标准品，取 14 管 1.5ml RNase Free 的 EP 管，按下表进行编号，将 RNase A 标准品(10mg/mL)，用标准品稀释液按下表稀释：

编号	配制过程	浓度
1	2μL 标准品原液+198μL 标准品稀释液	0.1mg/mL
2	2μL 编号 1 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-3}$ mg/mL
3	2μL 编号 2 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-5}$ mg/mL
4	2μL 编号 3 样本+198μL 标准品稀释液	$1 \times 10^{-7}$ mg/mL
5	100μL 编号 4 样本+100μL 标准品稀释液	$5 \times 10^{-8}$ mg/mL
6	100μL 编号 5 样本+100μL 标准品稀释液	$2.5 \times 10^{-8}$ mg/mL
7	100μL 编号 6 样本+100μL 标准品稀释液	$1.25 \times 10^{-8}$ mg/mL
8	100μL 编号 7 样本+100μL 标准品稀释液	$6.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
9	100μL 编号 8 样本+100μL 标准品稀释液	$3.125 \times 10^{-9}$ mg/mL

再将编号 6~9 样本用无 DNase 无 RNase 水稀释 10 倍：

10	20μL 编号 6 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$2.5 \times 10^{-9}$ mg/mL
11	20μL 编号 7 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$1.25 \times 10^{-9}$ mg/mL
12	20μL 编号 8 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$6.25 \times 10^{-10}$ mg/mL
13	20μL 编号 9 样本+180μL 无 DNase 无 RNase 水	$3.13 \times 10^{-10}$ mg/mL

编号 10~13 样本作为标准品；编号 14，无 DNase 无 RNase 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 14 个 1.5ml RNase 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
RNA 探针工作溶液	10
10×反应液	10
<b>总体积</b>	<b>100</b>

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。

荧光定量 PCR 仪参数设置为 VIC 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, VIC 为第 2 个通道，进行计算，第 1 个循环作为 RFU0，第 30 个循环作为 RFU30。

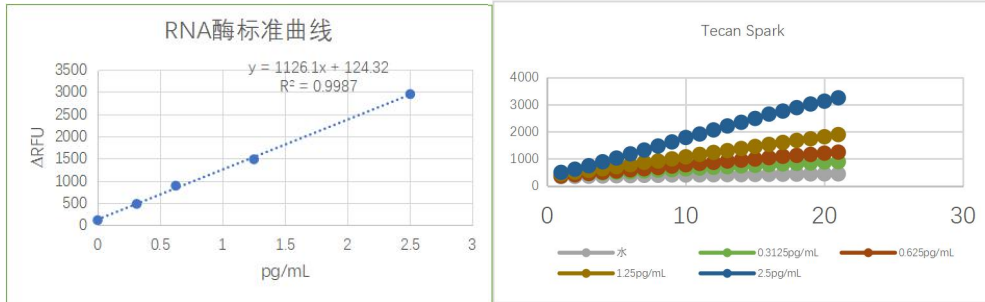
3.5 将 0 浓度样本、标准品及待测样本，按检测步骤一同测试，得到 RFU0、RFU30；计算  $\Delta RFU = RFU30 - RFU0$ ，将  $\Delta RFU$ (0 浓度)、 $\Delta RFU$ (标准品) 为纵坐标，标准品 RNase A 浓度为横坐标(0 浓度为 0)，进行线性拟合，求出拟合方程  $y = ax + b$ ，相关性系数  $r$  要  $\geq 0.99$ ，将  $\Delta RFU$ (污染样本) 作为  $y$  带入方程，求出  $x$ ，乘以样本预稀释倍数后，为样本的大致浓度值。

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。

## 六. 结果分析

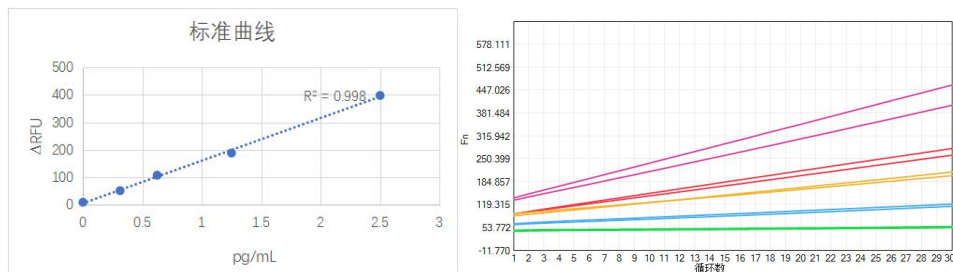
### 1. 酶标仪结果(以 Tecan Spark 为例)

Cycle	Time	Temp	水	0.3125pg/mL	0.625pg/mL	1.25pg/mL	2.5pg/mL	标准曲线						
1	0	36.8	341	360	399	401	397	369	437	443	501	503	pg/mL	ΔRFU
2	89.828	37	353	369	416	432	441	413	508	508	618	622	0	103.5
3	179.832	36.8	359	377	442	455	488	461	573	576	747	753	0.3125	475.5
4	269.837	36.5	366	388	471	480	535	504	650	635	893	904	0.625	885.5
5	359.837	36.5	377	394	491	507	584	550	734	714	1029	1029	1.25	1480
6	449.839	36.5	380	400	514	526	631	597	803	785	1184	1184	2.5	2770
7	539.842	36.6	392	397	544	554	674	636	876	873	1325	1329		
8	629.855	36.7	394	411	560	584	716	678	961	919	1472	1499		
9	719.862	36.7	407	417	592	603	769	734	1034	1000	1624	1632		
10	809.866	36.7	404	424	608	628	821	782	1103	1075	1787	1779		
11	899.879	36.7	409	424	636	659	862	831	1189	1163	1915	1922		
12	989.88	36.7	413	430	666	687	912	869	1257	1236	2066	2064		
13	1079.882	36.8	418	439	687	709	963	918	1344	1303	2213	2236		
14	1169.884	36.8	417	439	701	739	1001	950	1425	1382	2347	2376		
15	1259.892	36.8	423	446	722	757	1046	992	1498	1456	2489	2535		
16	1349.887	36.8	430	441	748	785	1097	1044	1595	1533	2650	2645		
17	1439.9	36.9	432	447	769	813	1148	1093	1659	1605	2761	2799		
18	1529.895	36.9	434	454	796	833	1179	1127	1721	1682	2888	2924		
19	1619.893	36.9	445	454	824	851	1208	1162	1801	1740	3021	3079		
20	1709.903	36.9	447	451	834	883	1256	1210	1879	1815	3126	3159		
21	1799.9	36.9	446	462	856	895	1290	1247	1946	1895	3250	3294		
30min/0min			1.3	1.3	2.1	2.2	3.2	3.4	4.5	4.3	6.5	6.5		
均值			1.3	2.19	3.31	4.37	6.52							
			无污染	有污染	有污染	有污染	有污染							
30min-0min			105	102	457	494	893	878	1509	1452	2749	2791		
均值			103.5	475.5	885.5	1480.5	2770							



### 2.qPCR 结果 (以宏石为例)

Cycle	Time	Temp	水	0.3125pg/mL	0.625pg/mL	1.25pg/mL	2.5pg/mL	标准曲线						
1	0min	36.8	42.85	45.07	66.19	60.89	87.2	93.24	92.73	92.42	162.26	159.46	pg/mL	ΔRFU
30	30min	37.5	52.14	53.97	116.95	113.01	202.94	192.51	281.22	280.32	580.43	536.21	0.3125	51.44
30min-0min			9.29	8.9	50.76	52.12	115.75	99.27	188.49	187.91	418.2	376.8	1.25	188.2
均值			9.1	51.44	107.51	188.2	397.46						2.5	397.46



## 七. 常见问题与解答

### Q1 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。

### Q2 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。

### Q3 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。

### Q4 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。

### Q5 DNase RNase 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。

### Q6 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/RNase 的污染, 实验用耗材使用 RNase-free 的耗材, 操作台面使用前应用 DNase/RNase 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。