

TransDetect® Fluorescence RNase Detection Kit

荧光法RNase残留检测试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM611

保存: -18°C及其以下温度下保存两年。

产品说明

TransDetect® Fluorescence RNase Detection Kit是一种用荧光法快速和高灵敏度检测样本中核糖核酸酶RNase残留的试剂盒。本试剂盒基于FRET实验原理: RNA探针作为底物, 5'端标记荧光报告基团(Fluor), 3'端 标记淬灭基团(Quencher)。当样本中不含RNase时, 底物荧光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, 底物被降解, 荧光基团和淬灭基团分离, 被激发的5'端荧光基团能量不再被3'端淬灭基团吸收猝灭, 此时即可检测到荧光信号。荧光信号随时间和RNase浓度增加而增强。本试剂盒对RNA探针底物进行了特殊设计, 可检测低至0.3 pg的RNase A; 并对多种RNase, 如RNase A、RNase T1、RNase I、微球菌核酸酶、S1 核酸酶、绿豆核酸酶和Benzonase等都有较好的检出效果。

适用范围

用于检测生物材料、实验环境、反应缓冲液、储存缓冲液等中的RNase。

不适用范围

- 该试剂盒通过采集荧光读取数值, 因此不适用于深颜色溶液, 其可能会干扰荧光激发, 影响结果判定。
- 抑制RNase活性或者降解RNA底物的溶液不适用: 比如强酸pH < 4、强碱pH > 9、SDS、EDTA、高盐离子等。

产品组成

Component	FM611-01 (96 T)	FM611-02 (480 T)
10×Reaction Buffer	1 ml	5 ml
RNase Substrate	1 ml	5 × 1 ml
Positive RNase A (30 pg/μl)	100 μl	500 μl
Nuclease-free Water	5 ml	25 ml

操作步骤

1. 实验开始前准备, 需对操作环境超净工作台进行消杀30分钟, 使用的移液器、枪头和EP管需为无核酸酶, 以免外源引入的RNase核酸酶对实验结果造成影响。

2. 样品准备:

冰箱取出TransDetect® Fluorescence RNase Detection Kit试剂盒, 室温充分溶解10 × Reaction Buffer、RNase Substrate、Nuclease-free Water。

- ① 样本为液体: 直接加样, 或用Nuclease-free Water稀释到合适浓度后再使用(参考“不适用范围”首次检测不确定检测浓度范围时);
- ② 样本为固体: 用Nuclease-free Water稀释到合适浓度后再使用;
- ③ 样本为固体表面: 用Nuclease-free Water处理固体表面后再使用;

3. 体系配置:

3.1 取10 μl RNase Substrate工作液到EP管中, 并注意避光。

3.2 加入10 μl 10 × Reaction Buffer到底物溶液中。

3.3 将待测样品补水到80 μl, 加入到对应的EP管中。每个待测样品和阴性对照重复数不少于2个, 至少一个阳性对照。按表1进行加样, 振荡离心混匀。



表1测试样品反应体系

	组分	RNase Substrate (μl)	10 × Reaction Buffer (μl)	Positive RNase A(μl)	Sample	Nuclease-free Water (μl)	Total Volume (μl)
1	阴性对照	10	10	-	-	80	100
2	阴性对照	10	10	-	-	80	100
3	阳性对照	10	10	5	-	75	100
4	待测样本1	10	10	-	80		100
5	待测样本1	10	10	-	80		100

4. 检测:

4.1 终点荧光检测:

- ① 以Invitrogen Qubit 4 荧光仪为例: 37°C孵育1小时后, 将阴性对照, 阳性对照, 待测样品管分别放入Invitrogen Qubit 4 荧光仪中, 选择“Fluorometer”进入荧光检测界面后, 再选择“Blue”进行检测, 记录荧光数值RFU。
- ② 以酶标仪为例: 37°C孵育1小时后, 设置荧光参数: 温度37°C, 终点荧光模式, 激发波长485 nm, 发射波长528 nm, 增益的设置需要根据阳性对照的值进行调整, 选取合适的增益值。
- ③ 以荧光定量PCR仪为例: 37°C孵育1小时后, 37°C 30秒(采集荧光), 1个循环, 反应体积100 μl, 采集荧光通道选择FAM。

4.2 实时荧光检测:

如果需要实时动态检测 RNase 活性数据, 可使用酶标仪和荧光定量PCR仪进行检测。

- ① 以酶标仪为例: 设置荧光参数: 检测前先振板5秒, 温度37°C, 每隔1分钟读取一次数值, 持续1小时, 开始动力学模式, 激发波长485 nm, 发射波长528 nm, 增益的设置需要根据阳性对照的值进行调整, 选取合适的增益值。
- ② 以荧光定量PCR仪为例: 37°C 1分钟(采集荧光), 50个循环 (反应总时长为1小时), 反应体积100 μl, 采集荧光通道选择FAM。

结果判读

阳性对照: RFU平均值/阴性对照RFU平均值≥20-100倍;

待测样品: 待测样品RFU平均值/阴性对照RFU平均值≥2, 则待测样品有RNase 污染;

附加操作步骤: 定量检测RNase A

TransDetect® Fluorescence RNase Detection Kit定量检测RNase A。对Positive RNase A进行2倍梯度稀释, RNase A可检测至浓度为0.03 pg/μl, 即检测限为0.3 pg, 且在稀释梯度内成线性关系 ($R^2 > 0.99$), 如下图1。

1. **0.1×Reaction Buffer的准备。**取10 μl 10×Reaction Buffer加入到990 μl Nuclease-free Water中, 混匀, 即得到 1ml 的 0.1×Reaction Buffer。
2. **使用0.1×Reaction Buffer 稀释Positive RNase A得到不同浓度的RNase A:** 1.92 pg/μl、0.96 pg/μl、0.48 pg/μl、0.24 pg/μl、0.12 pg/μl、0.06 pg/μl、0.03 pg/μl、0.15 pg/μl。
3. **按照下表配置反应体系**

表2 RNase A定量检测反应体系

Reagents	Volume
10 × Reaction Buffer	10 μl
RNase Substrate	10 μl
RNase A	10 μl
Nuclease-free Water	70 μl



4. 检测

以 Invitrogen Qubit 4 荧光仪为例。37°C 孵育 1 小时后，选择“Fluorometer”进入荧光检测界面后，再选择“Blue”进行检测，记录荧光数值 RFU。以下数据仅供参考。

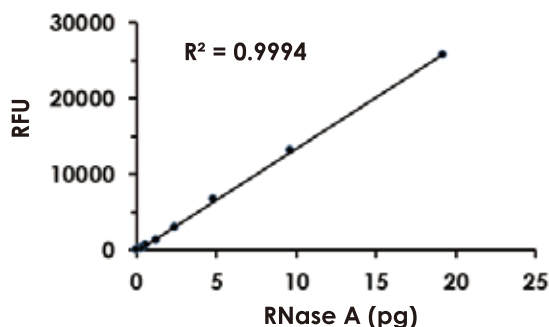


图1. RNase A 标准曲线图

注意事项:

1. 本试剂盒荧光基团的最大激发波长为490 nm，最大发射波长为520 nm。
2. 为最大程度降低交叉污染，阳对的RNase A的加入后，要对废弃枪头和垃圾桶立即做消杀处理。
3. 对于待测样品，如果盐离子浓度太高或者其中含有抑制物（如过酸、过碱、DEPC等）浓度较高，可能会导致得出阴性结果，此时需要对待测样品浓度进行稀释复测。
4. 如何判断样本是否兼容该试剂盒：按照实验操作步骤，孵育结束后，若未出现荧光，样品中加入5 μ l Positive RNase A进行反应，并重复孵育和检测荧光，此时如果出现强的信号值，则说明该样品无干扰，可兼容该试剂盒；若加入RNase A孵育后仍未有荧光，说明样品中有干扰物质不使用此试剂盒。
5. 若样品中含有能使蛋白变性（能让RNase失活）或者让RNA链断裂（导致RNA探针降解）的物质，则不能兼容该试剂盒，因为会导致假阴性或者假阳性。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202405

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

