



GENESEED® RNase assay Kit (Fluorescence)

产品简介

RNase 检测试剂盒基于荧光基团标记的 RNA 探针，当样本中不含 RNase 活性时，该探针稳定存在，不会产生荧光信号；当样本中含有 RNase 活性时，探针被降解，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。用荧光酶标仪在 $ex/em=535/575nm$ 波长下测定荧光信号增加倍数，判断样本是否被 RNase 污染。

产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® RNase assay Kit (Fluorescence)	H0601	48 Tests
	H0602	192 Tests

产品组分

名称	48 Tests	192 Tests	储存温度
10×反应液	0.5mL	2mL	-25~-15°C
RNA 探针	1 管	1 管	-25~-15°C
TE 缓冲液	0.5mL	2mL	-25~-15°C
RNase A 标准品(10mg/mL)	10 μ L	20 μ L	-25~-15°C
标准品稀释液	6mL	12mL	-25~-15°C
DEPC-treated Water	25mL	25mL	-25~30°C
DNase RNase 清除剂	50mL	50mL	2~30°C

运输与保存

1. -25~-15°C运输；试剂盒不同组分按上表温度分别储存；
2. 未开封试剂盒储存 12 个月；开封后试剂盒储存 6 个月，RNA 探针溶液建议根据单次使用量进行分装，避光储存，避免反复冻融。

注意事项

1. 加样操作应尽量快，时间过长会影响实验准确性；
2. 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；
3. 所有试剂使用前应充分摇匀，加样时应将所加样品加入酶标板孔中底部，避免加在孔壁上，加样时注意不可溅出，不可产生气泡；
4. 试剂盒中标准品为 RNase A, 其活性单位定义: 酵母 RNA 在 pH5.0 和 37°C条件下, 260nm 处的吸光度增加 1.0 对应的酶量, 50 个 RNase A 活性单位相当于 1 个 Kunitz 单位。
5. 为避免外源 RNase 污染，可使用核酸酶清除剂喷洒于实验台面、手套等表面，5 分钟后用洁净纸巾擦拭干净即可进行后续的实验操作。



使用说明

(一) 所需设备与耗材

荧光酶标仪 (含 Ex/Em = 535/575 nm 波长)

无 DNase、RNase 移液器与吸头

无 DNase、RNase EP 管

无 DNase、RNase 黑色不透明底 96 孔板

(二) 实验前准备

1. 将试剂盒取出平衡至室温 (18~25°C), 10×反应液、TE 缓冲液、RNase A 标准品 (10mg/mL)、标准品稀释液等组分充分振荡混匀, 然后瞬时离心 (4000~7000 rpm 离心 10 秒);
2. 将 RNA 探针 4000~7000 rpm 离心 60 秒, 使之聚集至管底, 小心开启管盖, 加入 40 μL 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 μL RNA 探针加入 490 μL 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 -25~-15°C 储存, 避免反复冻融。

(三) 检验步骤

增益值调节: 首次测试前调节合适的增益值, 以避免灵敏度下降或信号过饱和的风险:

参照下表, 设置仪器参数:

温度	37°C
模式	终点模式
检测前振板	10~15s
激发波长	λEx = 535 nm
发射波长	λEm = 575 nm

若仪器有自动增益选项, 则选用自动增益, 若没有自动增益选项, 则根据增益值范围设置中间值。

注: 不同仪器设置方法不一致, 具体咨询仪器供应商。

1. 在 96 孔板上选择 2 个孔, 每孔加入 10 μL RNA 探针工作溶液和 10 μL 10×反应液;
2. 其中 1 孔加入 80 μL DEPC-treated Water, 另外 1 孔加入 79 μL DEPC-treated Water+1 μL RNase A 标准品 (10mg/mL);
3. 37°C 避光放置, 30min 后测试;
4. 选用自动增益时, 在数据文件中的仪器参数栏会显示增益值 (Gain), 记为 G1;
5. 根据增益值范围设置中间值时, 需注意: 若加标准品孔的荧光值超过仪器上限, 则适当降低增益值, 若加标准品孔的荧光值远低于仪器上限, 则适当提高增益值; 最终得到合适的增益值, 记为 G2。



定性检测

1. 阳性对照配制: RNase A 标准品(10mg/mL)稀释用标准品稀释液按下表稀释:

编号	配制过程	浓度 mg/mL
1	2 μ L 标准品原液+198 μ L 标准品稀释液	0.1
2	2 μ L 编号 1 样本+198 μ L 标准品稀释液	1×10^{-3}
3	2 μ L 编号 2 样本+198 μ L 标准品稀释液	1×10^{-5}
4	2 μ L 编号 3 样本+198 μ L 标准品稀释液	1×10^{-7}
5	100 μ L 编号 4 样本+100 μ L 标准品稀释液	5×10^{-8}
6	20 μ L 编号 5 样本+180 μ L DEPC-treated Water	5×10^{-9}

将编号 6 样本 (5 pg/mL, 约 2.5×10^{-8} U/ μ L) 作为阳性对照; DEPC-treated Water 作为阴性对照。

2. 样品准备

推荐的样本体积为 80 μ L, 若待测样本不足 80 μ L, 用 DEPC-treated Water 稀释至 80 μ L。

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 DEPC-treated Water 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。

3. 测试仪器参数:

温度	37°C
检测前振板	10~15s
激发波长	$\lambda_{Ex} = 535 \text{ nm}$
发射波长	$\lambda_{Em} = 575 \text{ nm}$

增益值设定为检测步骤 1 中自动增益得到的 G1 或调节过的增益值 G2; 若酶标仪支持动力学检测, 推荐采用动力学检测模式, 1~1.5min 间隔, 总时间 30min。

4. 加样及检测

- 1) 96 孔板每孔加入 10 μ L RNA 探针溶液和 10 μ L 10 \times 反应液;
- 2) 选取其中 4 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, 每孔 80 μ L;
- 3) 立即测试读取 0min 荧光信号值 RFU₀, 37°C 避光放置 30min 后, 再次测试读取 30min 荧光信号值 RFU₃₀, 若采用动力学模式, 则可读取 0~30min 所有荧光信号。

(四) 检测结果的解释

若 RFU₃₀ \geq 2 \times RFU₀, 则考虑待测样本被 RNase 污染。

注: 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 RFU_{30} (待测样本) $< 2 \times RFU_0$ (待测样本)，导致假阴性判断，此时应将待测样本用 DEPC-treated Water 进行预稀释，再进行检测。

(五) 定量检测

当待测样本有污染，需判断样本中 RNase 的浓度值时，可通过以下程序测定：

将 RNase A 标准品 (10 mg/mL)，用标准品稀释液按下表稀释：

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

再将编号 6~9 样本用 DEPC-treated Water 稀释 10 倍：

10	20 μ L 编号 6 样本+180 μ L DEPC-treated Water	2.5×10^{-9}
11	20 μ L 编号 7 样本+180 μ L DEPC-treated Water	1.25×10^{-9}
12	20 μ L 编号 8 样本+180 μ L DEPC-treated Water	6.25×10^{-10}
13	20 μ L 编号 5 样本+180 μ L DEPC-treated Water	3.125×10^{-10}

编号 10~13 样本作为标准品；DEPC-treated Water 作为 0 浓度样本。

将 0 浓度样本、标准品及有污染的待测样本，按检测步骤一同测试，得到 RFU_0 、 RFU_{30} ；计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$ ，将 ΔRFU (0 浓度)、 ΔRFU (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 ≥ 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，为污染样本的大致浓度值。

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。

检测性能

检出限：RNase A: 0.313 pg/mL，约 1.56×10^{-9} U/ μ L；

精密度：批内变异系数 $\leq 10\%$ ，批间变异系数 $\leq 15\%$ 。