

RNase活性荧光检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0347S	RNase活性荧光检测试剂盒	100次
P0347M	RNase活性荧光检测试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发的RNase活性荧光检测试剂盒(RNase Activity Fluorometric Assay Kit, or Fluorometric RNase Assay Kit)是一种用荧光法快速高灵敏检测RNase A等核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)活性的试剂盒。
- 核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶(DNase)类似, 广泛存在于实验环境和生物物体中, 由于核酸酶能够降解核酸, 因此核酸酶的存在会对许多实验造成干扰[1]。文献中常见的检测RNase的方法通常耗时长, 并且检测灵敏度比较低。
- 本试剂盒检测灵敏度高, 可以检测到低至0.3pg的RNase A。本试剂盒也被称为核糖核酸酶活性荧光检测试剂盒、RNA酶活性荧光检测试剂盒、RNase A酶活性荧光检测试剂盒、荧光法RNase活性检测试剂盒或荧光法RNase A活性检测试剂盒。
- 核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)指通过水解RNA磷酸二酯键催化RNA降解的一种酶, 分为内切核糖核酸酶和外切核糖核酸酶。最常见的RNase包括RNase A、RNase T1和RNase H等, 其中RNase A和RNase T1常用于水解DNA或蛋白样品中RNA, 两者都对单链RNA表现出高活性[2]; 而RNase H可以特异性地水解DNA-RNA杂合链中的RNA, 而不能水解单链或双链DNA或RNA中的磷酸二酯键, 即不能消化单链或双链DNA或RNA[3]。
- RNase活性荧光检测试剂盒采用荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法, 其检测原理如图1所示。RNase底物是一种合成的RNA寡核苷酸探针, 其一端具有FAM荧光基团(Fluorophore)又称供体(Donor), 另一端具有TAMRA淬灭基团(Quencher)又称受体(Acceptor)。这两个基团的吸收光谱有一定的重叠, 当这两个荧光基团间的距离合适时, 荧光能量由供体向受体转移, 导致供体荧光分子自身的荧光强度衰减。当该底物被RNase切割后, 底物首尾两端分离, 两个基团分开, FAM的荧光不再被TAMRA淬灭, 即可检测到FAM的荧光, 这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测核酸酶的酶活性。FAM的最大激发波长为490nm, 最大发射波长为520nm。

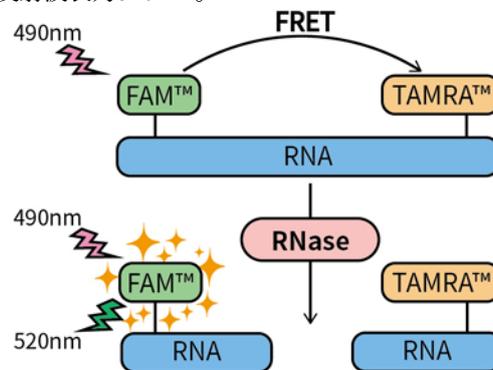


图1. 碧云天RNase活性荧光检测试剂盒检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 样品用量少。**本试剂盒中提供了RNase A阳性对照, 便于检测体系的建立。同时对RNase底物探针进行了优化, 灵敏度高, 可检测低至0.3pg RNase A活性。RNase A在0-10pg范围内有良好的线性关系, 可以通过设置标准曲线, 计算出样品中RNase A的活性。本试剂盒用于RNase A酶的检测结果参考图2。

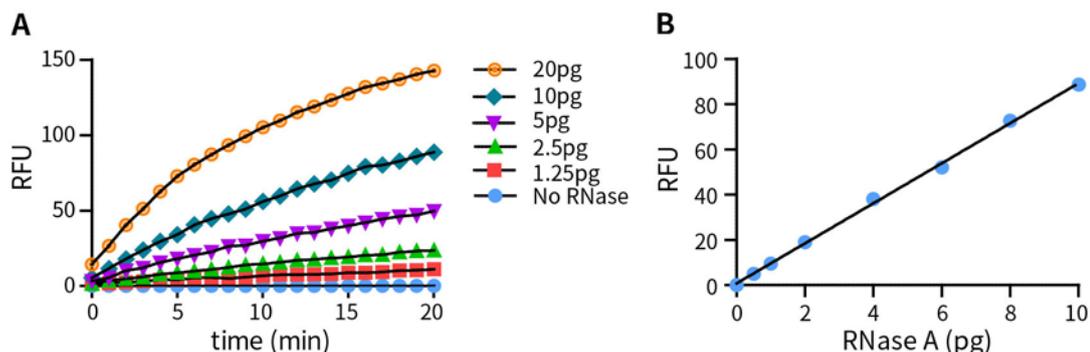


图2. 碧云天RNase活性荧光检测试剂盒对RNase A标准品的检测效果。图A为20分钟内本试剂盒检测不同量的RNase A的荧光强

度变化图。图B为不同量的RNase A标准品的检测效果，检测时间为20分钟。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **本试剂盒适用范围广，使用灵活，检测速度快。**本试剂盒不仅可以用于定量检测RNase A，也可检测多种其它核酸酶，相对于ELISA法更简单、更快速、更准确。已通过实验验证本试剂盒可以用于检测Mung Bean Nuclease、S1 Nuclease等酶的相对活性，但由于RNase H是特异性水解DNA-RNA杂合链中的RNA，所以本试剂盒不适用于RNase H的检测。本试剂盒也不太适用于高灵敏度检测RNase T1和BeyoZonase或Benzonase的活性。本试剂盒采用一步法检测，简单快速，全程仅需约20分钟即可完成。
- 用于96孔板检测时，本试剂盒小包装P0347S可以进行100次检测，中包装P0347M可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0347S-1	10X Reaction Buffer	2ml
P0347S-2	RNase A (10mg/ml)	10 μ l
P0347S-3	RNase Substrate	1ml
P0347S-4	Nuclease-free Water	20ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0347M-1	10X Reaction Buffer	10m
P0347M-2	RNase A (10mg/ml)	25 μ l
P0347M-3	RNase Substrate	5ml
P0347M-4	Nuclease-free Water	100ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。其中P0347-3 RNase Substrate须避光保存。

注意事项：

- 由于核糖核酸酶广泛存在于环境中，而且相对比较稳定，建议在超净工作台或生物安全柜等相对洁净的环境中进行核糖核酸酶的活性检测，以免待检样品受环境中核糖核酸酶的影响。
- 10X Reaction Buffer、RNase Substrate和Nuclease-free Water需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。RNase A (10mg/ml)使用时应置于冰上，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 请确保样品pH值在7-8之间，或加入样品后反应体系的pH值在7-8之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 本试剂盒可能对一些核糖核酸酶不适用，例如RNase H。一般情况下，本试剂盒中提供的10X Reaction Buffer对大多数核酸酶是通用的，但也存在对一些特定的酶不适用的情况。如有必要请用特定核酸酶的缓冲液对样品进行稀释和反应。
- 操作时请注意防止试剂被RNase污染，如有必要，每次实验可使用碧云天的RNase and DNase Away (R0123)清除环境中存在的RNase。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 试剂盒的准备。

- 将10X Reaction Buffer、RNase Substrate和Nuclease-free Water等试剂平衡至室温后分别混匀备用。RNase A (10mg/ml)存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 将10X Reaction Buffer用Nuclease-free Water稀释为1X。例如取100 μ l 10X Reaction Buffer，加入900 μ l Nuclease-free Water，混匀，即得1ml的1X Reaction Buffer。

2. 样品的准备。

用1X Reaction Buffer 将待测样品稀释至适当浓度(首次检测不确定浓度范围时，可以进行梯度稀释)，置于冰上备用。

3. RNase A标准曲线的设置。

注：本步骤为选做步骤，适用于样品中仅含RNase A时RNase A的定量检测或参照RNase A酶活性的其它RNase检测。

将RNase A (10mg/ml)用1X Reaction Buffer稀释至适当的浓度梯度。初次检测时可设置为0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 μ g/ μ l，分别取10 μ l加入96孔板中，此时，RNase A量分别为0、0.625、1.25、2.5、5、10 μ g。也可自行设置适宜的RNase A浓度进行标准曲线的设定。

4. 检测体系的设置。

参照下表依次加入试剂盒各组分及样品。初次检测时，待测样品可进行适当稀释。

Reagent	Blank Control	Positive Control	Sample
1X Reaction Buffer	90µl	80µl	80µl
RNase A	0	10µl	0
Sample	0	0	10µl
RNase Substrate	10µl	10µl	10µl
Total Volume	100µl	100µl	100µl

注1：为获得更加可靠的检测结果，建议每个样品设置平行孔或3个复孔。

注2：若已经制作了RNase A标准曲线，则无需设置阳性对照。

5. 检测。

a. 振荡混匀1-2分钟，确保混合充分。

b. 混匀后立即使用荧光酶标仪进行荧光测定。设置荧光酶标仪温度为37°C，激发波长为490nm、发射波长为520nm，每3分钟或5分钟读取一次数值。

注1：连续测定的时间可以根据待测样品中RNase活性进行调整，但是需确保获得6个点以上的数据。对于RNase的酶活性较高的样品，建议测定总时间为20分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟；对于RNase酶活性很低的样品，可以延长测定总时间为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟。

注2：如果荧光酶标仪没有温控功能，也可以在室温测定，但这样检测出来的是室温条件下的酶活性，此时酶活性可能会偏低一些，不同的实验条件偏低的程度会有所不同。

6. 计算。

根据检测出来的荧光强度比较样品中RNase的相对酶活。若进行RNase A检测时，可通过绘制的标准曲线及样品荧光强度值进行样品中RNase A酶活的计算。本试剂盒用于RNase A标准品的检测结果参考图2。

参考文献：

1. Kolarevic A, Yancheva D, Kocic G, Smelcerovic A. Eur J Med Chem. 2014. 88:101-11.
2. delCardayré, S B, and Raines, R T. Biochemistry. 1994. 33, 6031-6037.
3. Hausen, P., and Stein, H. Eur. J. Biochem. 1970. 14, 278-283.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0345S	DNase活性荧光检测试剂盒	100次
P0345M	DNase活性荧光检测试剂盒	500次
P0346S	DNase I残留检测试剂盒	100次
P0346M	DNase I残留检测试剂盒	500次
P0347S	RNase活性荧光检测试剂盒	100次
P0347M	RNase活性荧光检测试剂盒	500次
P0349S	Benzonase核酸酶残留检测试剂盒	100次
P0349M	Benzonase核酸酶残留检测试剂盒	500次

Version 2022.03.23