



DNASE/RNASE ASSAY KIT FLUORESCENT PROBE METHOD

DNase/RNase检测试剂盒 (荧光探针法)

瀚海新酶生物科技有限公司



C 目 录 CONTENTS

DNase/RNase检测试剂盒（荧光探针法） P01

背景
检测原理
产品图片

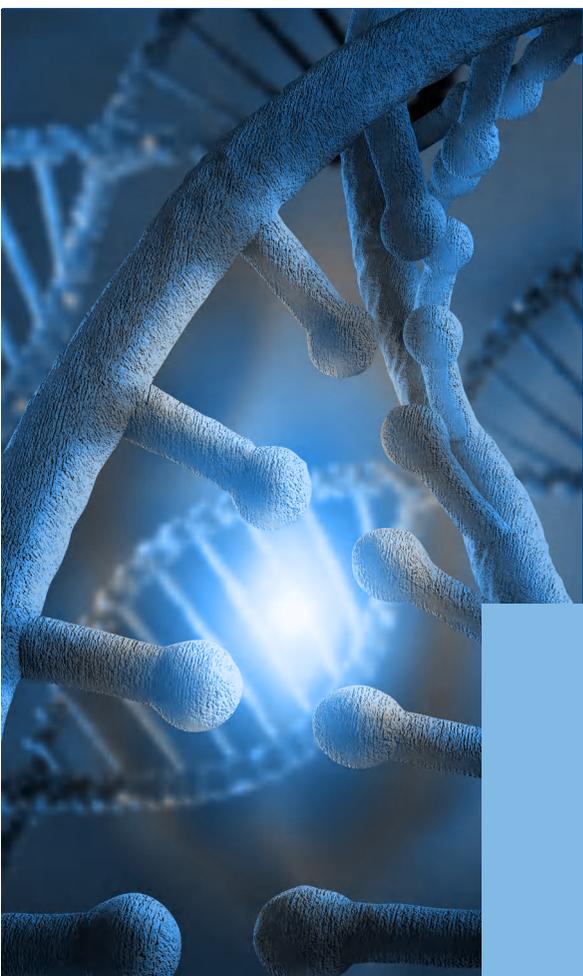
DNase检测试剂盒（荧光探针法） P03

适用范围
产品特点
灵敏度优于凝胶电泳法
灵敏度优于进口品牌
试剂盒主要组成成分
实验前需要您准备的设备与耗材
实验操作（详见说明书）
Q&A
产品信息

RNase检测试剂盒（荧光探针法） P09

适用范围
产品特点
灵敏度优于凝胶电泳法
灵敏度优于进口品牌
试剂盒主要组成成分
实验前需要您准备的设备与耗材
实验操作（详见说明书）
Q&A
产品信息

背景 Background



近年来，mRNA合成技术的应用越来越广泛，对mRNA疫苗、药物研究和生产过程中质量控制的要求也在不断提高。脱氧核糖核酸酶(DNases)和核糖核酸酶(RNases)是普遍存在于环境和许多生物材料中的一类酶。它们可以降解DNA或RNA，对许多涉及DNA及RNA的研究和生产过程造成影响。由于mRNA分子的脆弱性，抑制或消除研究、生产环境中的核酸酶活性显得极为重要。

为此，我们需要一种快速、灵敏的方法来检测环境（如实验台面，移液器吸头、储液袋、反应器等耗材）及物料（如抗体、酶、缓冲液）等的核酸酶活性，判定是否存在DNases或RNases污染和定量评估污染的程度。

界定无污染的方法，在《USP43》、《EP10》及《中国药典2020版》等文件中尚无明确规定。核酸水解-紫外分光光度法定量限仅为 $0.01\text{U}/\mu\text{L}$ ，不适合微量核酸酶的活性检测。

核酸水解-凝胶电泳法受实验人员的主观判断影响较大，无法准确定量，另外操作时间长也降低了测定通量。高效液相色谱(HPLC)及电化学法等，则耗时费力，且受限于仪器设备。对此，有研究人员[1]提出了荧光探针法，不仅灵敏度高、检测速度快，且能实现核酸酶活性的定量检测。而DNase/RNase荧光探针法检测试剂盒正是最佳选择之一。

检测原理

DNase和RNase检测试剂盒的原理相同。

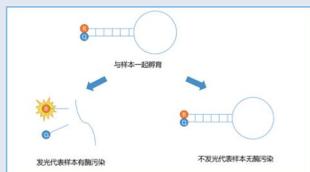
设计出标记有荧光基团的DNA探针和RNA探针，与测试样本混合。

当样本中不含DNases或RNases活性时，该探针稳定存在，荧光基团和淬灭基团距离较近，由于荧光共振能量转移原理，不会产生荧光信号；

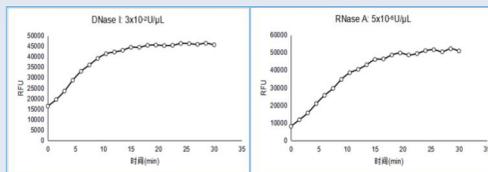
当样本中含有DNases或RNases活性时，探针被降解，荧光基团和淬灭基团相互远离，从而产生逐渐增强的荧光信号；

荧光增加的速率与酶的数量和活性成正相关。

原理如下图所示：



图一 荧光探针法原理示意图



图二 DNase/RNase检测试剂盒反应曲线示意图

产品图片





DNASE ASSAY KIT

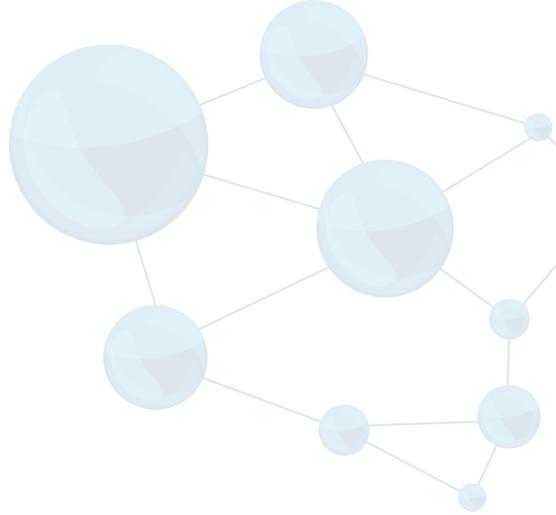
(FLUORESCENT PROBE METHOD)

DNase检测试剂盒（荧光探针法）

用于检测科研和生产过程中环境、
物料等的DNase污染情况。

检测试剂盒 (荧光探针法)

DNase Assay Kit



适用范围

用于检测科研和生产过程中环境、物料等的DNase污染情况。

产品特点

灵敏度高：检出限低至 1.25×10^{-6} U/ μ L (DNase I)，仅为进口同种试剂盒的1/8

精密度高：批内CV \leq 10%，批间CV \leq 15%

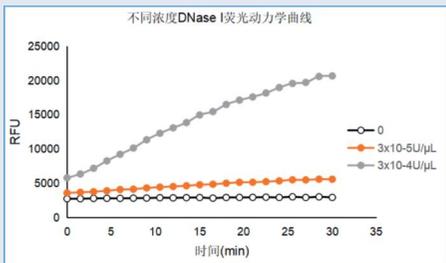
稳定性好：-20 $^{\circ}$ C下有效期一年。探针溶液配制好后分装，在-20 $^{\circ}$ C储存

HH DNase检测试剂盒的精密度与稳定性

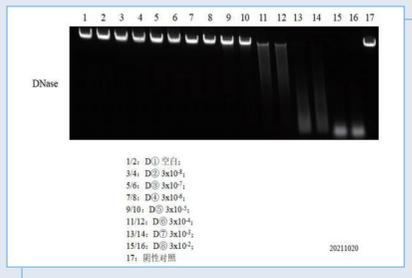
批号	20220106	20220316	20220425
批内CV	低值样本:3.8% 高值样本:5.4%	低值样本:2.1% 高值样本:4.1%	低值样本:5.0% 高值样本:9.4%
批间CV	低值样本:3.9% 高值样本:6.5%		
稳定性	探针干粉37 $^{\circ}$ C放置7d,与放置0d的偏差符合要求; 探针溶解后-20 $^{\circ}$ C放置179d,测试性能符合要求(持续监测中)。		

灵敏度优于凝胶电泳法

HH DNase检测试剂盒与核酸水解-凝胶电泳法对比，测定相同的低浓度酶样本，如图所示：



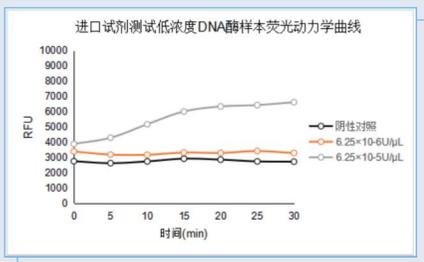
HH DNase检测试剂盒测定 $3 \times 10^{-5} \text{ U}/\mu\text{L}$ DNase I, 与0浓度可明显区分



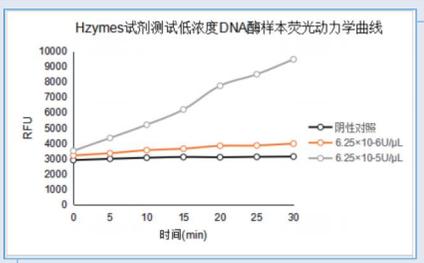
电泳法测定DNase I, 9/10通道($3 \times 10^{-5} \text{ U}/\mu\text{L}$)与1~8通道($\leq 3 \times 10^{-6} \text{ U}/\mu\text{L}$)、17通道阴性对照不能明显区分

灵敏度优于进口品牌

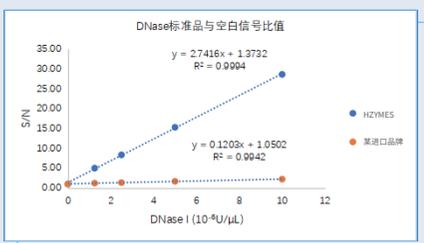
与某进口品牌（荧光探针法）相比，HH DNase检测试剂盒检测下限低至其1/8。



样本浓度为 $6.25 \times 10^{-6} \text{ U}/\mu\text{L}$ 时, 进口DNase检测试剂盒与阴性对照区分不明显



样本浓度为 $6.25 \times 10^{-6} \text{ U}/\mu\text{L}$ 时, HH DNase检测试剂盒与阴性对照可明显区分



低浓度DNase I ($1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ U}/\mu\text{L}$)时, 进口品牌测出的S/N值接近1, HH品牌呈倍数增加

试剂盒主要组成成分

与某进口品牌（荧光探针法）相比，HH DNase检测试剂盒检测下限低至其1/8。

表：HH DNase检测试剂盒组分

序号	名称	192T	48T
01	10×反应液	2.0mL	0.5mL
02	DNA探针	1管	1管
03	TE缓冲液	2.0mL	0.5mL
04	DNase I标准品 (2U/μL)	20μL	10μL
05	标准品稀释液	12mL	6mL
06	无DNase无RNase 水	25mL	25mL
07	DNase RNase清除剂	50mL	50mL

注：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1μg pBR322 DNA所需的酶量[1]，一个DNase I活性单位相当于0.3 Kunitz单位[2]。

实验前需要您准备的设备与耗材

荧光酶标仪(含 ex/em=485/525nm 波长)

无DNase无RNase 移液器与吸头

无DNase无RNase EP管

无DNase无RNase 黑色不透明底96孔板

实验操作（详见说明书）

- 1、HH DNase检测试剂盒取出，室温放置适当时间，各组分充分混匀、离心。
- 2、配制DNA探针工作溶液并分装，未使用的置于-25~-15°C避光储存，避免反复冻融。
- 3、设置仪器参数：37°C，终点模式，Ex/Em波长为485/525nm，检测前振板10-15s。
- 4、调节合适的增益值，并设定，如酶标仪支持动力学检测，推荐采用动力学检测模式。

5、定性检测：在96孔板上选四个孔：2 μ L标准品原液用标准品稀释液和无DNase水无RNase水稀释至 2×10^5 U/ μ L 80 μ L作为阳性对照；80 μ L无DNase无RNase水作为阴性对照，80 μ L样本两份（如不足用无DNase无RNase水稀释至80 μ L）。每孔中加入10 μ L DNA探针工作溶液和10 μ L $10 \times$ 反应液。立即读取RFU₀，37 $^{\circ}$ C避光放置30min后，读取RFU₃₀。

若 $RFU_{30}(\text{待测样本}) \geq 2 \times RFU_0(\text{待测样本})$ ，则考虑待测样本被DNase污染。

6、定量检测：取2 μ L标准品原液用标准品稀释液和无DNase水稀释至 1×10^5 U/ μ L、 5×10^6 U/ μ L、 2.5×10^6 U/ μ L、 1.25×10^6 U/ μ L，作为标准品，无DNase无RNase水作为0浓度样本，同定性检测步骤，计算 $\Delta RFU = RFU_{30} - RFU_0$ ，以 ΔRFU 为纵坐标，标准品DNase I浓度为横坐标（进行线性拟合，求出拟合方程 $y = ax + b$ ，将 $\Delta RFU(\text{待测样本})$ 作为 y 带入方程，求出 x ，乘以样本预稀释倍数后，为待测样本的大致浓度值。）

Q&A

Q1：HH DNase检测试剂盒的反应温度和时间是怎样的？

请将反应体系置于37 $^{\circ}$ C恒温条件下进行实验，反应时间为30分钟。

Q2：什么情况下可能出现假阳性或假阴性结果或定量结果不准确？

- a. 凝胶缓冲液、高浓度的粘性物质、表面活性剂和深色溶液可能干扰荧光基团发光；
- b. 如果待测样本溶液中含有抑制DNA酶活性的物质，则测定结果为样本溶液的整体酶活性，而不是其中的酶的活性。这些物质包括：
 - 高离子强度溶液（如5M NaCl、20x SSC、3M乙酸钠等）
 - pH<4或pH>9的缓冲液
 - 离液剂、洗涤剂、螯合剂或任何使蛋白质变性的溶液（如SDS、硫氰酸胍、尿素、EDTA等）
- c. 引起DNA探针化学性质不稳定性溶液，如pH>9的溶液、苛性溶液（强酸强碱、漂白剂等）

Q3: 制备标准品溶液时，前面的步骤为什么要用标准品稀释液稀释而不是用无DNase无RNase水稀释？

因为标准品在标准品稀释液中比较稳定，即使多次稀释也不会改变它本身的活性。如果用水稀释，多步操作可能会造成标准品的活性改变，标准曲线产生偏差。

Q4: 如何调节合适的酶标仪增益值？

如您的酶标仪有自动增益选项，则选用自动增益。如您的酶标仪没有自动增益选项，则根据增益值范围先设置中间值，然后根据反应后阳性对照孔（79 μ L无DNase无RNase水 + 1 μ L DNase I标准品）的荧光值来调节合适的增益值：如超过仪器上限，则适当降低增益值，如远低于仪器上限，则适当调高增益值。

Q5: 为什么严重污染的样本可能会出现假阴性的结果？

判定DNase污染的标准是：RFU₃₀(待测样本) \geq 2 \times RFU₀ (待测样本)，即反应30分钟时的RFU值达到0分钟的RFU值的2倍以上。如果样本被严重污染，则有可能反应开始时速度很快，在非常短的时间测到一个很高的RFU₀值，出现RFU₃₀(待测样本) < 2 \times RFU₀(待测样本)的假阴性结果。此时需要用无DNase无RNase水来稀释待测样本。

Q6: 阴性对照的RFU值不为0，就说明阴性对照被污染了吗？

不一定。阴性对照通常也能够测到较低的RFU值，但不会随着反应时间的延长值显著增加，一般认为30分钟的RFU₃₀小于0分钟的RFU₀的2倍就说明阴性对照没有被污染。

产品信息

货号	品名	规格
HBP002902	DNase检测试剂盒（荧光探针法） DNase assay Kit (Fluorescence)	192 Tests
HBP002903	DNases检测试剂盒（荧光探针法） DNase assay Kit (Fluorescence)	48 Tests



RNASE ASSAY KIT

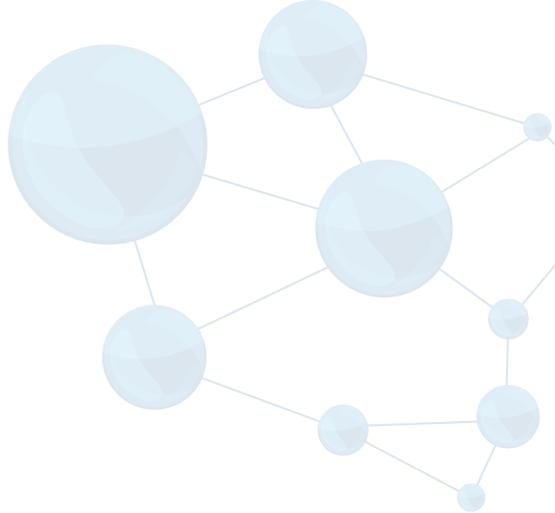
(FLUORESCENT PROBE METHOD)

RNase检测试剂盒（荧光探针法）

用于检测科研和生产过程中环境、
物料等的RNase污染情况。

RNase Assay Kit

检测试剂盒 (荧光探针法)



适用范围

用于检测科研和生产过程中环境、物料等的RNase污染情况。

产品特点

灵敏度高：检出限低至RNase A：0.313pg/mL，约 1.56×10^{-9} U/ μ L，仅为进口同种试剂盒的1/8

精密度高：批内CV \leq 10%，批间CV \leq 15%

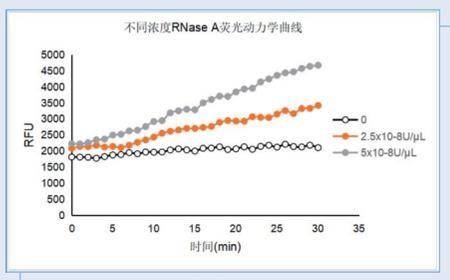
稳定性好：-20 $^{\circ}$ C下有有效期一年。RNA探针溶液配制好后分装，在-20 $^{\circ}$ C储存

HH RNase检测试剂盒的精密度与稳定性

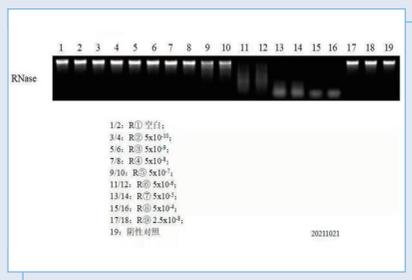
评价项目	20220106批	20220420批	20220510批
批内CV	低值样本:9.4%	低值样本:6.2%	低值样本:8.4%
	高值样本:5.5%	高值样本:6.2%	高值样本:8.3%
批间CV	低值样本:10.3%	高值样本:5.4%	
稳定性	探针干粉37 $^{\circ}$ C放置7d,与放置0d的偏差符合要求; 探针溶解后-20 $^{\circ}$ C放置182d,测试性能符合要求。		

灵敏度优于凝胶电泳法

HH RNase检测试剂盒与核酸水解-凝胶电泳法对比，测定相同的低浓度酶样本，如图所示：



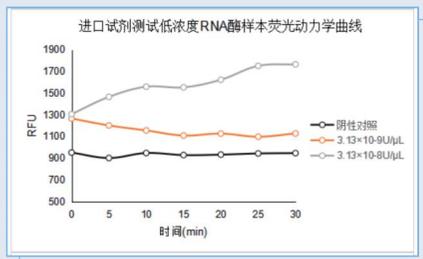
HH RNase检测试剂盒测定RNase A, 2.5×10^{-8} U/ μ L与0浓度可明显区分



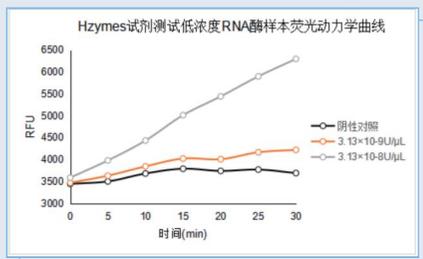
电泳法测定RNase A, 1~8通道(5×10^{-8} U/ μ L)与17、18通道(2.5×10^{-8} U/ μ L)、19通道阴性对照无法区分

灵敏度优于进口品牌

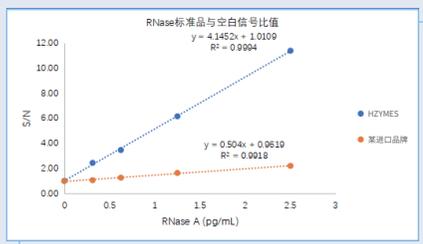
与某进口品牌（荧光探针法）相比，HH RNase检测试剂盒检测下限低至其1/8。



样本浓度为 3.13×10^{-9} U/ μ L时，进口RNase检测试剂盒与阴性对照区分不明显



样本浓度为 3.13×10^{-9} U/ μ L时，HH RNase检测试剂盒与阴性对照可明显区分



低浓度RNase A (1×10^{-6} ~ 10×10^{-6} pg/mL) 时，进口品牌测出的S/N值为1-2之间，HH品牌呈倍数增加

试剂盒主要组成成分

表：HH RNase检测试剂盒组分

序号	名称	192T	48T
01	10×反应液	2.0mL	0.5mL
02	RNA探针	1管	1管
03	TE 缓冲液	2.0mL	0.5mL
04	RNase A标准品(10mg/mL)	20μL	10μL
05	标准品稀释液	12mL	6mL
06	无DNase无RNase 水	25mL	25mL
07	DNase RNase清除剂	50mL	50mL

注：标准品为RNase A，其活性单位定义为：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[3]，50个RNase A活性单位相当于1个Kunitz单位[4]。

实验前需要您准备的设备与耗材

荧光酶标仪(含 ex/em=535/575nm 波长)

无DNase无RNase 移液器与吸头

无DNase无RNase EP管

无DNase无RNase 黑色不透明底96孔板

实验操作（详见说明书）

- 1、HH RNase检测试剂盒取出，室温放置适当时间，各组分充分混匀、离心。
- 2、配制RNA探针工作溶液并分装，未使用的置于-25~-15°C避光储存，避免反复冻融。
- 3、设置仪器参数：37°C，终点模式，Ex/Em波长为535/575nm，检测前振板10-15s
- 4、调节合适的增益值，并设定，如酶标仪支持动力学检测，推荐采用动力学检测模式

5、定性检测：在96孔板上选四个孔：2 μ L RNase A标准品原液（10mg/mL）用标准品稀释液和无DNase水无RNase水稀释至5pg/mL（ 2.5×10^{-8} U/ μ L）80 μ L作为阳性对照；80 μ L无DNase无RNase水作为阴性对照，80 μ L样本两份（如不足用无DNase无RNase水稀释至80 μ L）。每孔中加入10 μ L RNA探针工作溶液和10 μ L 10 \times 反应液。立即读取RFU0，37 $^{\circ}$ C避光放置30min后，读取RFU30。

若 $RFU30(\text{待测样本}) \geq 2 \times RFU0(\text{待测样本})$ ，则考虑待测样本被RNase污染。

6、定量检测：取2 μ L RNase A标准品原液（10mg/mL）用标准品稀释液和无DNase水稀释至 2.5×10^{-9} mg/mL、 1.25×10^{-9} mg/mL、 6.25×10^{-10} mg/mL、 3.13×10^{-10} mg/mL，作为标准品，无DNase无RNase水作为0浓度样本，同定性检测步骤，计算 $\Delta RFU = RFU30 - RFU0$ ，以 ΔRFU 为纵坐标，标准品RNase A浓度为横坐标，进行线性拟合，求出拟合方程 $y = ax + b$ ，将 ΔRFU （待测样本）作为y带入方程，求出x，乘以样本预稀释倍数后，为待测样本的大致浓度值。

Q&A

Q1：HH RNase检测试剂盒的反应温度和时间是怎样的？

请将反应体系置于37 $^{\circ}$ C恒温条件下进行实验，反应时间为30分钟。

Q2：什么情况下可能出现假阳性或假阴性结果或定量结果不准确？

- 存在可能干扰荧光基团发光的物质，可能导致假阴性结果；
- 如果待测样本溶液中含有抑制RNA酶活性的物质，可能导致假阴性结果；
- 引起RNA探针化学性质不稳定性溶液，可能导致假阳性或假阴性结果。

Q3：制备标准品溶液时，前面的步骤为什么要用标准品稀释液稀释而不是用无DNase无RNase水稀释？

因为标准品在标准品稀释液中比较稳定，即使多次稀释也不会改变它本身的活性。如果用水稀释，多步操作可能会造成标准品的活性改变，标准曲线产生偏差。

Q4：如何调节合适的酶标仪增益值？

如您的酶标仪有自动增益选项，则选用自动增益。如您的酶标仪没有自动增益选项，则根据增益值范围先设置中间值，然后根据反应后阳性对照孔（79 μ L无DNase无RNase水+1 μ L RNase A标准品）的荧光值来调节合适的增益值：如超过仪器上限，则适当降低增益值，如远低于仪器上限，则适当调高增益值。

Q5：为什么严重污染的样本可能会出现假阴性的结果？

判定RNase污染的标准是：RFU30(待测样本) $\geq 2 \times$ RFU0（待测样本），即反应30分钟时的RFU值达到0分钟的RFU值的2倍以上。如果样本被严重污染，则有可能反应开始时速度很快，在非常短的时间测到一个很高的RFU0值，出现RFU30(待测样本) $< 2 \times$ RFU0(待测样本)的假阴性结果。此时需要用无DNase无RNase水来稀释待测样本。

Q6：阴性对照RFU值不为0，就说明阴性对照被污染了吗？

不一定。阴性对照通常也能够测到较低的RFU值，但不会随着反应时间的延长而RFU值显著增加，一般认为30分钟的RFU30小于0分钟的RFU0的2倍就说明阴性对照没有被污染。

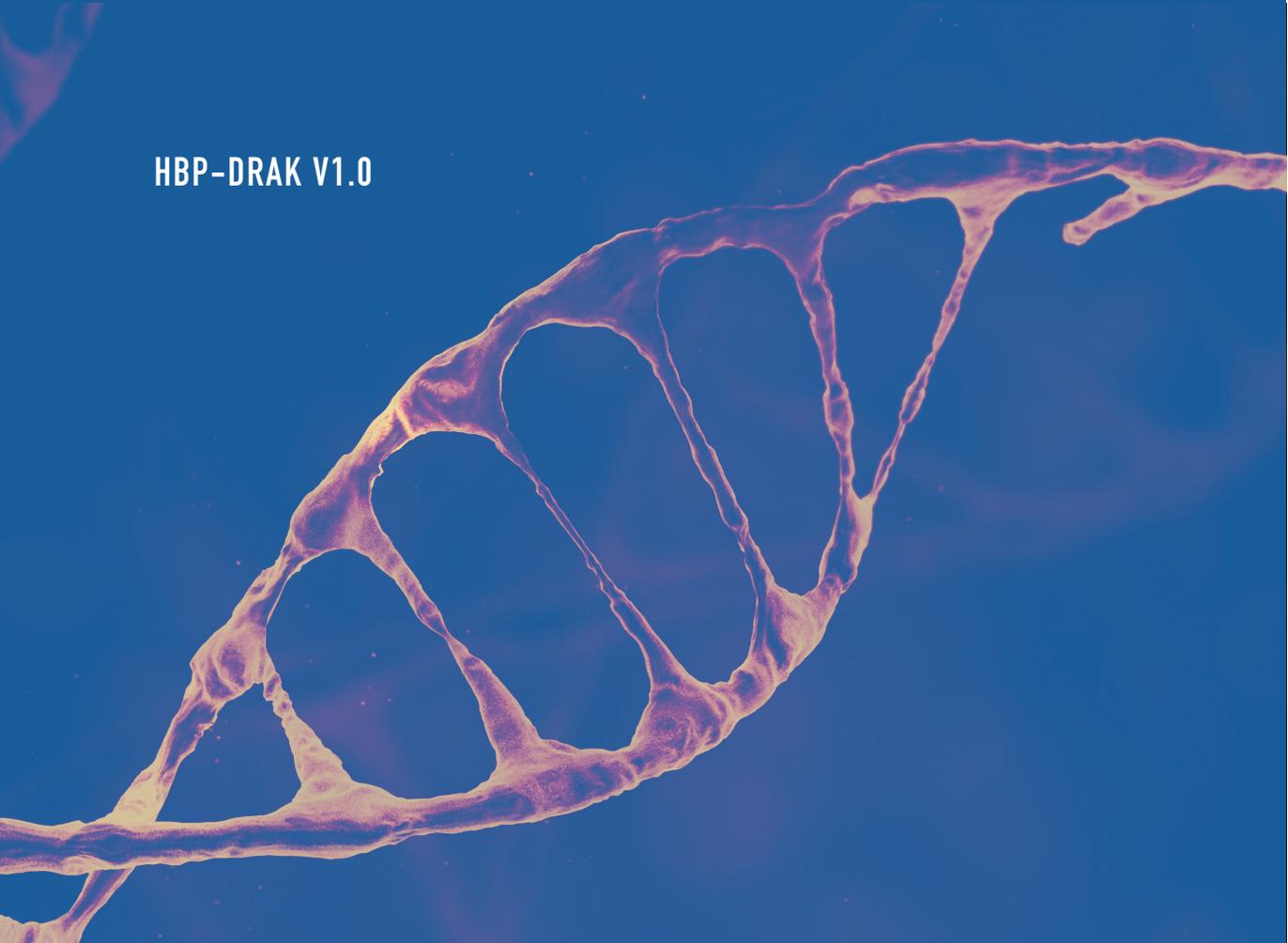
产品信息

货号	品名	规格
HBP003002	RNase检测试剂盒（荧光探针法） RNase assay Kit (Fluorescence)	192 Tests
HBP003003	RNases检测试剂盒（荧光探针法） RNase assay Kit (Fluorescence)	48 Tests

参考文献

- [1] New England Biolabs DNase I产品手册
- [2] Kunitz M. Crystalline Desoxyribo - nuclease I. Isolation and General Pro - perties Spectrophotometric Method for the Measurement of Desoxyribonuclease Activity[J]. The Journal of General Physiology, 1950, 33(4):349-362.
- [3] Thermo scientific RNase A(DNase and Protease-free) 产品手册
- [4] Kunitz, M. A. A spectrophotometric method for the measurement of ribonuclease activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 1946, 3(2):308-320.

HBP-DRAK V1.0



HZYMES

瀚海新酶生物科技有限公司
HZYMES BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

营销中心:上海市奉贤区沪杭公路1588号凤创谷3号楼7楼

订货电话:13122818113 邮编:201400 传真:021-60877362转819

生产基地:武汉市高科园三路9号武汉精准医疗产业基地

技术咨询电话:027-65528952 邮编:420075 网址:www.hzymes.com



—— 公众号 ——



—— 业务咨询 ——