

TransDetect[®] Fluorescence DNase Detection Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM601

保存: -20°C保存两年。

产品说明

TransDetect[®] Fluorescence DNase Detection Kit是一种用荧光法快速和高灵敏度检测样本中脱氧核糖核酸酶DNase残留的试剂盒。本试剂盒基于FRET实验原理: DNA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DNase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DNase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'端淬灭基团吸收淬灭, 此时即可检测到荧光信号。荧光信号随时间和DNase浓度增加而增强。本试剂盒对DNA探针底物进行了特殊设计, 可检测低至 10^{-3} U的DNase I, 并对多种DNase, 如DNase I、Exonuclease III、微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)、S1 核酸酶(S1 nuclease)、绿豆核酸酶(mung bean nuclease)和全能核酸酶(Benzonase nuclease)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DNase。

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DNase 活性或者降解DNA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	FM601-01 (96 T)	FM601-02 (480 T)
10×Reaction Buffer	1 ml	5 ml
DNase Substrate	1 ml	5×1 ml
DNase I (1U/μl)	10 μl	50 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DNase核酸酶对实验结果造成影响。

2. 样品准备:

冰箱取出 TransDetect[®] Fluorescence DNase Detection Kit试剂盒, 室温充分溶解DNase Substrate、10 × Reaction Buffer、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. 阳性对照DNase I的准备:

3.1 获得1×Reaction Buffer: 取100 μl 10 × Reaction Buffer 加入到900 μl Nuclease-free Water中, 混匀, 即得到1 ml 1×Reaction Buffer。

3.2 DNase I稀释: 对提供的1 U/μl的DNase I进行50倍稀释: 取1 μl DNase I (1U/μl)加入到49 μl 1×Reaction Buffer中, 即得到50 μl的阳性对照DNase I。

4. 体系配置:

4.1 取10 μl DNase Substrate溶液到EP管中。

4.2 加入10 μl 10 × Reaction Buffer到含有底物溶液的EP管中。



4.3 将待测样本补水到80 μl ，加入到对应的EP管中。每个待测样本和阴性对照重复数不少于2个，至少一个阳性对照DNase I（即3.2中稀释50倍后的DNase I），加入5 μl 。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	DNase Substrate (μl)	10 \times Reaction Buffer (μl)	阳性对照 DNase I (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

5. 检测:

5.1 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535 nm，发射波长556 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VIC/HEX。

5.2 实时荧光检测:

如果需要实时动态检测 DNase 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535 nm，发射波长556 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（总时长1小时），反应体积100 μl ，采集荧光通道选择VIC/HEX。

结果判读

阳性对照: RFU平均值/阴性对照RFU平均值 \geq 20-100倍；

待测样品: 待测样品RFU平均值/阴性对照RFU平均值 \geq 2，则待测样品有DNase 污染；

附加操作步骤: 定量检测DNase I

TransDetect® Fluorescence DNase Detection Kit定量检测DNase I。对DNase I进行稀释，可检测至浓度为 10^{-3} U的DNase I，且在稀释浓度内成线性关系（ $R^2 > 0.99$ ），如下图1。

1. 0.1 \times Reaction Buffer的准备。取10 μl 10 \times Reaction Buffer加入到990 μl Nuclease-free Water中，混匀，即得到1 ml的0.1 \times Reaction Buffer。

2. 使用0.1 \times Reaction Buffer 稀释DNase I (1U/ μl)得到不同浓度的DNase I: 0.064 U、0.032 U、0.016 U、0.008 U、0.004 U、0.002 U、0.001 U、0.0005 U

3. 按照下表配置反应体系

表2 DNase I 定量检测反应体系

Reagents	Volume
10 \times Reaction Buffer	10 μl
DNase Substrate	10 μl
DNase I	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。

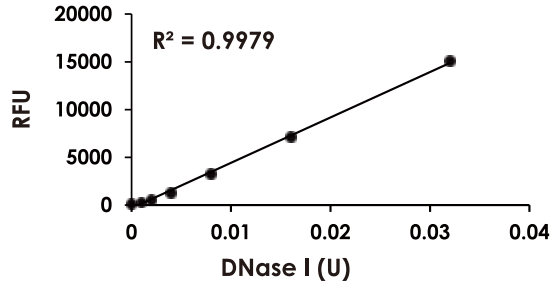


图1. DNase I 标准曲线图

注意事项:

1. 本试剂盒荧光基团的最大激发波长为535 nm，最大发射波长为556 nm。
2. 为最大程度降低交叉污染，阳性对照的DNase I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 阳性对照 DNase I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；若加入阳性对照DNase I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DNase失活）或者让DNA链断裂（导致DNA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

