

核酸酶残留量测定法（核酸荧光底物法）操作说明

1 仪器

具有荧光功能的酶标仪、生物安全柜、振荡器、多通道移液枪。

2 试剂及耗材

标准品：核酸酶（Merck，货号：1.01697.0001）

DNaseAlert™ QC System (Thermo Fisher Invitrogen, 货号：AM1970)

无核酸酶水（碧云天，货号：R0021）

无核酶全黑 96 孔板（碧云天，货号：FCP966）

低蛋白吸附 EP 管 1.5 ml（Eppendorf，货号：0030108442）

无核酶枪头

3 实验方法

标准品溶液的配制：取核酸酶标准品，用无核酸酶水稀释制成 10U/ml（建议每步稀释不超过 50 倍，每次稀释需要更换枪头并充分振荡混匀），随后进行梯度稀释制成 5 U/ml、2.5 U/ml、1 U/ml、0.5 U/ml、0.1 U/ml 的标准品溶液。

供试品溶液的配制：取供试品，必要时可将供试品用无核酸酶水稀释制成每 1ml 中含适宜浓度（0.1~5U）核酸酶的溶液，稀释方法与标准品保持一致。

空白溶液的配制：以无核酸酶水为空白溶液。

DNA 荧光底物溶液的配制：取一支 DNaseAlert Substrate (2 nmol/tube)，向其中加入试剂盒中的 TE Buffer 1mL，混匀。

操作步骤：取酶标板，每孔分别加入试剂盒中的 DNA 荧光底物溶液 10 μ l、10X NucleaseAlert Buffer 10 μ l，以及标准品溶液、供试品溶液或空白溶液 80 μ l（双孔平行测定），轻轻振摇后，迅速放入酶标仪中进行荧光检测。酶标仪检测温度为 37 $^{\circ}$ C、激发波长为 530nm，发射波长为 580nm，每分钟读取一次每孔的相对荧光强度（RFU），持续 20 分钟。

按试剂盒使用说明书进行操作。选择并固定合适的荧光增益。每分钟读取一次 RFU，持续记录 20 分钟的测定结果。

4 结果计算

选择标准品溶液与供试品溶液的线性反应阶段，以读取时间为横坐标，以 RFU 为纵坐标，分别计算标准品溶液和供试品溶液的线性回归方程，其斜率即为

标准品溶液和供试品溶液的 RFU 变化率, 0.1U/ml 标准品溶液线性回归方程的相关系数应不低于 0.95。

以标准品浓度为横坐标, 以 RFU 变化率为纵坐标, 计算线性回归方程, 其相关系数应不低于 0.98。根据供试品溶液的 RFU 变化率计算供试品中核酸酶的残留量。

5 附注

(1) 直接与标准品和供试品接触的器具应为低蛋白吸附的塑料制品或其他适宜器具, 试验中采用的耗材均需无核酸酶。

(2) 标准品和供试品与荧光底物混合后应尽快进行检测。

(3) 空白溶液反应稳定后不应出现明显的荧光强度变化。

(4) 在 pH8.0, 37℃ 条件下, 2.625ml 反应体积水解 0.1 mg/ml 的鲑鱼精子 DNA 30 分钟, 在 260nm 处吸光度变化值为 1.0 的酶量, 为 1 个核酸酶活力的单位。

(5) 推荐采用试剂盒 (Thermo Fisher Invitrogen DNaseAlert™ QC System 或其他适宜试剂盒, 默克核酸酶作为标准品), 试剂盒的验证应至少包括专属性、准确度、精密度、线性和范围等内容。

(6) 本次实验的核酸酶标准品酶活力可参考默克的厂检报告。