

本科实习报告（编号 Exon20210130）

学生姓名：郑子纯 学校：昆士兰大学 实习单位：广州市外显子生物

1. 实验目的：

检测尿液中是否存在 DNase（DNA 酶）和 RNase（RNA 酶）。

2. 实验原理：

实验室环境中常常会有核酸酶的存在。在分子生物学实验中经常需要用到的高质量 DNA 或 RNA 样品会被这些核酸酶迅速分解，因此保证环境中没有 DNA 酶和 RNA 酶是很重要的。使用 DNA 酶或 RNA 酶检测试剂可以快速地检测 DNA 酶和 RNA 酶。

其利用的原理是荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer (FRET)）。荧光能量共振转移是距离 10 nm 以内的两个荧光分子间产生的一种非放射性的能量转移现象。FRET 现象发生在供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的吸收光谱重叠的时候。此时供体的荧光强度比它单独存在时要低的多（荧光淬灭），而受体发出的荧光却大大增强。检测试剂是一条特异性寡核苷酸序列，一端是荧光素，另一端则是会与其产生 FRET 的荧光熄灭剂。在活性 DNA 酶或 RNA 酶存在情况下，检测试剂会被分解，两端的分子分离，不再产生 FRET 现象，荧光强度恢复。所以如果在样品中检测到荧光，则说明有活性 DNA 酶或 RNA 酶；如无法检测到荧光，则样品中没有受到 DNA 酶或 RNA 酶的污染。

3. 材料和方法

3.1 材料与试剂

- 1) TEK 缓冲液 (DEPC 0.1%)
- 2) MgCl₂ 溶液 (2M, pH 7.4)
- 3) UUBe 探针
- 4) DNA 酶 (标准溶液)
- 5) 样品：尿液，菌液，漱口水
- 6) 仪器：Real-time PCR System TL988



实验条件

3.2 实验步骤：

- (1) 对于疑似被 DNA 酶/RNA 酶污染的样品：分别将尿液 (5 μ l, 10 μ l)，菌液 (5 μ l)，漱口水 (5 μ l) 添加至 4 支试管中。重复试验 1 次。
- (2) 阳性对照：分别添加 5 μ l 和 10 μ l 的 DNA 酶到 2 支试管中。重复试验 1 次。
- (3) 将 10 μ l MgCl₂ 溶液加入 1 ml TEK 缓冲液中。混合均匀后，取 500 μ l，向其加入 15 μ l 探针。混合均匀后，分别向步骤 (1) 和 (2) 中的试管中 (共 12 支) 加入 30 μ l

此混合液。

(4) 阴性对照：四个阴性对照分别为：30 μ l 混合液-1，30 μ l 混合液-2，30 μ l 混合液+5 μ l 水，30 μ l 尿液。

(5) 测量：在末点检测模式下测量在 42 $^{\circ}$ C 下初始 (1hr) 的荧光。具体设定如图表 1 所示。

4. 实验结果

4.1 实验显示阳性结果阳性，阴性结果阴性，提示实验条件正常。

为了确保实验结果的正确性，我们设置了阴性和阳性对照。实验结果如表格 1 所示，试管编号 1-4 以及 9-12 的结果为阳性，其余的为阴性。如图表 2 和 3 所示，阳性试管的荧光数据随时间增大，最后稳定在一个最大值；阴性试管的荧光数据则一直为零。

表格 1. 实验结果

编号	内容物	结果	编号	内容物	结果
1	30 μ l 混合液+5 μ l 尿液-1	阳性	9	30 μ l 混合液+5 μ l DNA 酶-1	阳性
2	30 μ l 混合液+5 μ l 尿液-2	阳性	10	30 μ l 混合液+5 μ l DNA 酶-2	阳性
3	30 μ l 混合液+10 μ l 尿液-1	阳性	11	30 μ l 混合液+10 μ l DNA 酶-1	阳性
4	30 μ l 混合液+10 μ l 尿液-2	阳性	12	30 μ l 混合液+10 μ l DNA 酶-2	阳性
5	30 μ l 混合液+5 μ l 菌液-1	阴性	13	30 μ l 混合液-1	阴性
6	30 μ l 混合液+5 μ l 菌液-2	阴性	14	30 μ l 混合液-2	阴性
7	30 μ l 混合液+5 μ l 漱口液-1	阴性	15	30 μ l 混合液+5 μ l 水	阴性
8	30 μ l 混合液+5 μ l 漱口液-2	阴性	16	30 μ l 尿液	阴性

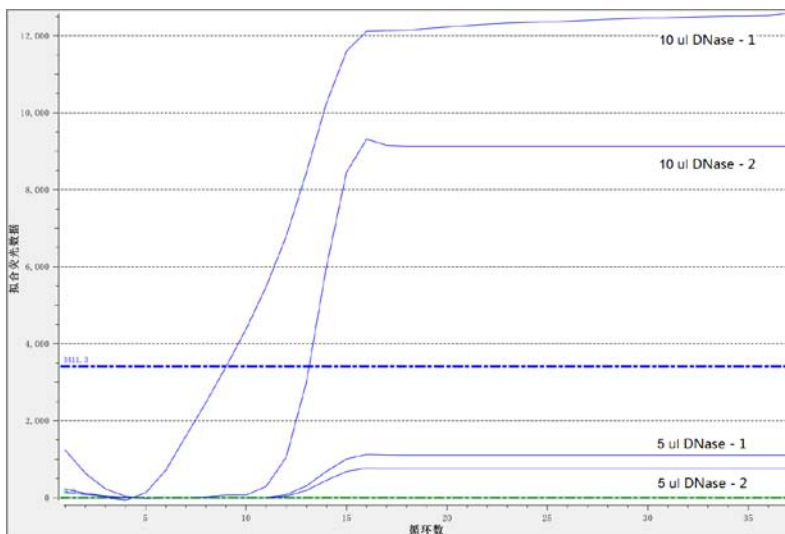
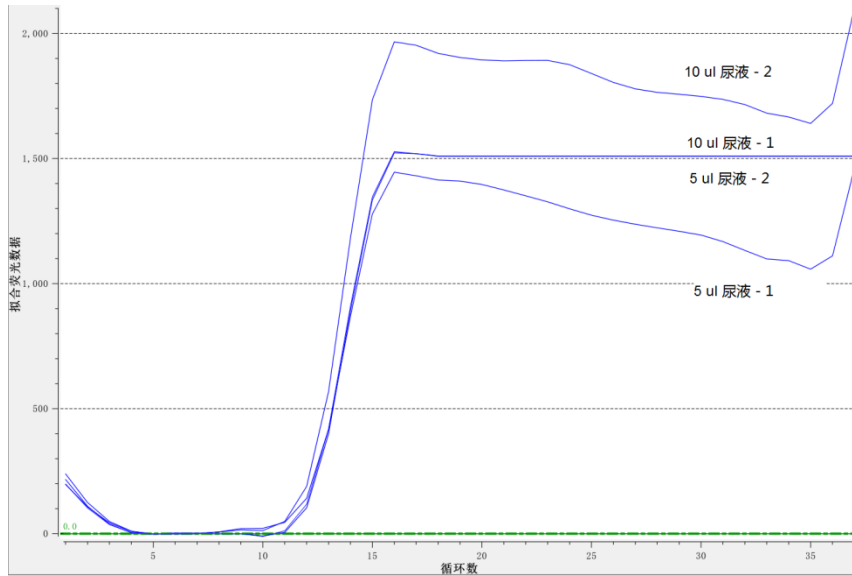


图 1. 阳性对照与阴性对照的荧光数据

4.2. 尿液检测结果显示尿液含有 DNase 和 RNase 阳性

上述结果显示阳性对照和阴性对照正常，提示实验操作步骤无误，为了进一步检测尿液是否含有 DNase 或 RNase，我们进行你尿液的检测，并依次加入不同体积的尿液，结果提示：当尿液的量从 5 u1 增加到 10 u1 时，检测出的荧光强度也随之增加。最后的荧光值反映了酶的相对量，荧光值越高说明酶的含量越高。



图表 1. 样品的荧光数据

5. 讨论:

实验结果显示 DNase 和 RNase 的阳性标本显示阳性，而对照显示阴性，提示实验步骤没有问题。一般情况下，菌液和漱口液存在 RNase，然而本实验菌液和漱口液的结果为阴性，说明其不含有 DNA 酶或 RNA 酶，或灵敏度不够，需要进一步优化实验，提高灵敏度，优化的条件包含特异性序列的优化，温度的优化，反应体系的优化等等。

同时，在尿液的结果为阳性，且其阴性对照（单纯的尿液）为阴性，说明其含有 DNA 酶或 RNA 酶，且排除了尿液自发荧光的可能性。阳性对照和阴性对照的结果符合预期，排除了因试剂导致的假阴性和假阳性。

当尿液和 DNA 酶的量从 5 u1 增加到 10 u1 时，检测出的荧光强度也随之增加。最后的荧光值反映了酶的相对量，荧光值越高说明酶的含量越高。对于 DNA 酶，其产生的荧光强度约为之前的 10 倍，但是对于尿液，含量的多少对荧光强度的影响则小得多。重复试验的结果有一定数值上的差异，但对于定性的结果没有影响。实验中每个试管的终体积不相同，但由于荧光检测测量的是体系里的荧光分子个数，终体积的变化对结果影响不大。

综上所述，该方法可以检测 DNase 和 RNase 的浓度，但是进一步的实验条件需要优化。为进一步开发 DNase 和 RNase 的检测奠定了基础。