

E.coli 总 RNA 残留检测中 DNase I 消除 gDNA 干扰

目的：在进行 E.coli 总 RNA 残留检测时，样本中往往残留有 E.coli 基因组 DNA，残留的基因组 DNA 会干扰总 RNA 残留检测，导致 RNA 残留检测值被高估。因此，需要对样本进行 DNase I 处理以消除 gDNA 的影响。

方法：为避免样本的基质效应影响 DNase I 活性，建议进行 RNA 前处理提取后，再进行 DNase I 处理。

使用终浓度为 2U/μl 的 DNase I，37℃处理 60 分钟。在 20μl 体系中可有效清除 3 ng E.coli DNA 对后续检测造成的影响。对于质粒样本，上述 20μl 体系可消化 3 ng 质粒和 3 ng E.coli 基因组 DNA 的混合样本。处理后的样本在 75℃孵育 10 分钟以灭活 DNase I，后续可直接进行 RNA 残留检测。

- SHENTEK® E.coli 总 RNA 残留检测试剂盒（RT-PCR 荧光探针法，货号：1201201）
- RNA 前处理提取推荐使用：SHENTEK®宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）（货号 SK030203D100），洗脱时采用 RNase-Free H₂O 替代试剂盒中洗脱液。
- DNase I 可使用：TaKaRa 公司 Recombinant DNase I（RNase-Free）（货号 Code No. 2270），或者其他等效产品。

举例：待测样本如果含有很高浓度的 DNA，可用 RNase-Free H₂O 稀释至 300 pg/μl 以下（稀释倍数 N）。取 10 μl 待测样本，加入 2 μl 10×DNase I Buffer，8μl DNase I，混匀，总体积 20 μl。37℃处理 60 分钟。75℃处理 10 分钟灭活。冰上降温，瞬时离心，漩涡混匀后，取 5μl 样本进行残留 RNA 检测。计算如下：

$$\text{样本所含 RNA} = \text{检测值} \times 2N \quad (N \text{ 为样本稀释倍数})$$