

产品名称

dsRNA 残留定量检测试剂盒

产品规格

96T/盒

预期用途

本试剂盒用于样品中双链 RNA(dsRNA)的定量检测，仅供研究使用。

产品概述

使用 T7 RNA 聚合酶体外转录 (IVT, In Vitro Transcription) 制备 mRNA 的过程中会产生双链 RNA (dsRNA, double-stranded RNA) 等副产物，dsRNA 除了会触发机体的天然免疫反应，还可能导致 mRNA 发生降解。所以双链 RNA(dsRNA)的残留量是 mRNA 药物的关键质量属性。本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫法(ELISA)检测体外转录体系或合成的 mRNA 原液中 dsRNA 的含量。用捕获抗体包被微孔板，形成固相抗体，向固相抗体微孔板中加入 dsRNA 标准品和待测样品，再加入生物素化检测抗体孵育，形成抗体-抗原-抗体复合物，洗涤后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素 (streptavidin, SA)。经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色，显色液在 HRP 酶的催化下转化成蓝色并在酸的作用下最终转换成黄色，颜色的深浅与样品中 dsRNA 的量呈正相关。

试剂盒组分

	组分	规格	储存温度
盒 1	dsRNA 标准品 (无修饰 UTP, 3 μ g/mL)	50 μ L \times 1 管	-20 \pm 5 $^{\circ}$ C
	dsRNA 标准品 (pUTP 修饰, 3 μ g/mL)	50 μ L \times 1 管	
	dsRNA 标准品 (N1-Me-pUTP 修饰, 3 μ g/mL)	50 μ L \times 1 管	
	捕获抗体	35 μ L \times 1 管	
	检测抗体	50 μ L \times 1 管	
	SA-HRP	10 μ L \times 1 管	
盒 2	酶标板	12 \times 8 孔, 96 孔	2-8 $^{\circ}$ C
	浓缩洗涤液 (20 \times)	25 mL \times 1 瓶	
	包被液	12 mL \times 1 瓶	
	封闭液	20 mL \times 1 瓶	
	样品稀释液	30 mL \times 1 瓶	
	抗体稀释液	24 mL \times 1 瓶	
	显色液	12 mL \times 1 瓶	
	终止液	6 mL \times 1 瓶	
	封板膜	4 张	
	说明书	1 份	

注：本试剂盒不可与其他商品化试剂盒混用。

自备材料

去离子水或蒸馏水、洗板机、微量移液器、恒温箱、酶标仪与配套灭菌枪头、加样槽、吸水纸等耗材。

储存条件及有效期

1. 盒 1 于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存，盒 2 于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存，避免强光直射，有效期 6 个月。
2. 酶标板拆封使用后，应将剩余酶标板密封，在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存并于有效期内使用。
3. 盒 1、盒 2 使用结束后需及时放回相应的储存条件下保存。
4. 盒 1 试剂在使用时应减少反复冻融次数。

检验方法

1. 酶标板准备

- 1.1. 配制 $1 \times$ 包被工作液：将 $5 \mu\text{L}$ 捕获抗体加入 1.7 mL 包被液中，上下颠倒混匀至少 30 次，制备成 $1 \times$ 包被工作液，可根据实际用量增量 10% 配制。
- 1.2. 酶标板每孔加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ 包被工作液。
- 1.3. 将酶标板水平置于 4°C 过夜包被。
- 1.4. 将试剂盒从冷藏环境中取出，放置室温 ($18-28^{\circ}\text{C}$) 平衡至少 30 min。
- 1.5. 配制 $1 \times$ 洗涤液：将浓缩洗涤液 ($20 \times$) 用去离子水或蒸馏水 20 倍稀释，混匀备用。例如 10 mL 浓缩洗涤液 ($20 \times$) 用 190 mL 去离子水或蒸馏水稀释。
- 1.6. 弃掉孔内液体，每孔至少加入 $300 \mu\text{L}$ $1 \times$ 洗涤液，静置浸泡 60 s，洗板 2 次，洗板完成后尽量去除残留液体。
- 1.7. 酶标板每孔加入 $180 \mu\text{L}$ 封闭液，置于 37°C 封闭 2 h。

2. 实验前准备

2.1. 标准品的配制：配制过程可参考下方表 1 和表 2。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新配制的标准品溶液。由于实验室条件不同，标曲响应范围可能存在差异，可根据实验结果调整线性范围，保证标曲拟合大于 6 个点。若反应性偏高，可降低标曲首点浓度，反之则提高标曲首点浓度。

A：无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 标准品：取标准品原液 ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$) 稀释 1000 倍后为标准品的第一个点 ($3 \text{ ng}/\text{mL}$)，再 2 倍倍比稀释成 1.5、0.75、0.375、0.187、0.093、0.047 ng/mL 。

B：N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 标准品：取标准品原液 ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$) 稀释 500 倍后为标准品的第一个点 ($6 \text{ ng}/\text{mL}$)，再 2 倍倍比稀释成 3、1.5、0.75、0.375、0.187、0.093 ng/mL 。

表 1 无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 标准品的配制

移取	加入至	dsRNA 标准品浓度
$1 \mu\text{L}$ 的 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品母液	$999 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$3 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $3 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$1.5 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $1.5 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$0.75 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $0.75 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$0.375 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $0.375 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$0.187 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $0.187 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$0.093 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的 $0.093 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准品	$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	$0.047 \text{ ng}/\text{mL}$
$500 \mu\text{L}$ 的样品稀释液	空管(对照孔)	$0 \text{ ng}/\text{mL}$

表 2 N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 标准品的配制

移取	加入至	dsRNA 标准品浓度
2μL 的 3μg/mL 的标准品母液	998μL 的样品稀释液	6ng/mL
500μL 的 3ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	3ng/mL
500μL 的 1.5ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	1.5ng/mL
500μL 的 0.75ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	0.75ng/mL
500μL 的 0.375ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	0.375ng/mL
500μL 的 0.187ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	0.187ng/mL
500μL 的 0.093ng/mL 的标准品	500μL 的样品稀释液	0.093ng/mL
500μL 的样品稀释液	空管(对照孔)	0ng/mL

2.2. 配制 1×检测抗体：将检测抗体用抗体稀释液稀释成 1×检测抗体，假配制 1.7mL，则需要取 7.5μL 检测抗体，根据检测数确定稀释体积(每孔 100 μL)。注意取样前将检测抗体充分混匀。

2.3. 配制 1×SA-HRP：将 SA-HRP 用抗体稀释液稀释成 1×酶标试剂，假配制 1.7mL，则需要取 0.7μL SA-HRP，根据检测数确定稀释体积(每孔 100 μL)。注意取样前将 SA-HRP 充分混匀。

3. 检测步骤

3.1 加样：封闭好的酶标板弃掉孔板中的所有液体，确保孔中无液体残留。在酶标板中每孔加入 100μL 样品/标准品，用封板膜封板后，放入 37°C 恒温培养箱孵育 1h。（当无法估计待测样品中的 dsRNA 大概含量时，应当用样品稀释液做多个稀释倍数做检测，以免含量过高不能够读取有效数值。）

3.2 洗板：孵育完成后，小心揭去封板膜，弃掉孔内液体，每孔至少加入 300μL 1×洗涤液，静置浸泡 60s，连续洗板 4 次，最后一次尽量去除残留液体。

3.3 加检测抗体：以每孔 100μL 加样量加入 1×检测抗体，用封板膜封板后，放入 37°C 恒温培养箱孵育 1h。

3.4 洗板：孵育完成后，小心揭去封板膜，弃掉孔内液体，每孔至少加入 300μL 1×洗涤液，静置浸泡 60s，连续洗板 4 次，最后一次尽量去除残留液体。

3.5 加酶标结合物：以每孔 100μL 加样量加入 1×SA-HRP，用封板膜封板后，放入 37°C 恒温培养箱孵育 1h。

3.6 孵育完成后，小心揭去封板膜，弃掉孔内液体，每孔至少加入 300μL 1×洗涤液，静置浸泡 60s，连续洗板 4 次，最后一次尽量去除残留液体。

3.7 按每孔 100μL TMB 显色液加入酶标板，用封板膜封板后，放入 37°C 恒温培养箱避光孵育 25min。

3.8 终止/读值：每孔加入 50μL 终止液，轻轻混匀后用酶标仪检测各孔在 450nm 单波长处 OD 值，15min 内完成读值。

结果分析

1. 校准品和样品孔测得的 OD 值扣除对照孔的 OD 值用于结果计算。

2. 以校准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，采用四参数方式拟合绘制校准曲线。如有设置复孔，则应取其平均值计算。检测时，校准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.99$ ，否则实验无效。

3. 将样品的 OD 值代入校准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，即为样品的实际浓度。若样品 OD 值高于校准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。每次实验均应生成新的校准曲线，以理论浓度标准品绘制的标准曲线如下图 1 所示。

dsRNA 浓度 ng/mL	OD 样本-OD 对照孔
3	1.5427
1.5	1.2441
0.75	0.7706
0.375	0.4253
0.1875	0.2048
0.09375	0.108
0.046875	0.0501
0	0

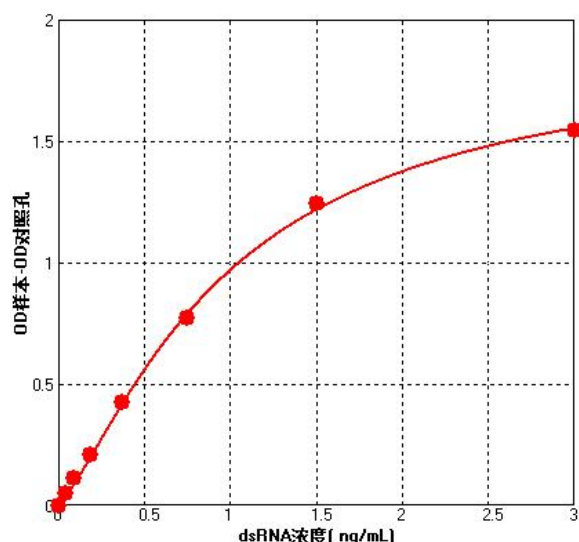


图 1 dsRNA 标准品（无修饰 UTP）的标准曲线

产品性能

1. 精密度：板内变异系数<10%；板间变异系数<15%。
2. 准确度：80%-120%。
3. 线性范围：无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.047-3ng/mL；N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.093-6ng/mL。

注意事项

1. 操作前仔细阅读使用说明书，严格按照试剂盒说明书进行实验操作。
2. 避免在恶劣的环境(如含有 84 消毒液、次氯酸钠、酸碱或乙醛等高强度腐蚀性气体及灰尘的环境)条件下进行实验，实验室消毒应在实验结束后进行。RNA 酶III和全能核酸酶能降解 dsRNA，所以切勿在含有 RNA 酶III以及全能核酸酶的环境中进行实验。
3. 试剂盒应平衡至室温再使用，试剂使用前应充分摇匀，各组分储存与用法请严格按照使用说明。试剂使用后，剩余试剂及时密封，参考说明书进行保存。
4. 酶标板可拆卸，每次将需用数量的板条取出后，其余未用板条须放回铝箔袋内于 2- 8℃储存待用。避免对酶标仪底部刮花或其他影响光密度测量的操作。
5. 捕获抗体、标准品、检测抗体、SA-HRP 体积较少，使用前可用离心机将管壁、管盖上的液体离心至管底。
6. 封板膜不可重复使用。不同批号的试剂组分不可混用，微量移液器枪头不可混用，以免交叉污染。
7. 洗板推荐使用洗板机，洗板过程中避免串流或气泡，以防影响实验结果准确性。最后一次洗板后，应将孔中残留的液体拍干。
8. 请在反应终止后 15 min 内进行读值。
9. 为了您的安全和健康，操作中须佩戴一次性手套和实验室规定的防护物品。
10. 本产品仅供科学研究使用。