

产品名称

dsRNA 残留定量检测试剂盒 2.0

产品规格

32T/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, 因此 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, 然后添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体, 形成抗体-抗原-抗体复合物, 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) | 15 μ L \times 1 管 | -20 \pm 5 $^{\circ}$ C |
| | dsRNA 标准品 (pUTP 修饰, 3 μ g/mL) | 15 μ L \times 1 管 | |
| | dsRNA 标准品 (N1-Me-pUTP 修饰, 3 μ g/mL) | 15 μ L \times 1 管 | |
| | 检测抗体 | 10 μ L \times 1 管 | |
| 盒 2 | 抗 dsRNA 抗体预制酶标板 | 4 \times 8 孔, 32 孔 | 2-8 $^{\circ}$ C |
| | 浓缩洗涤液 (20 \times) | 6 mL \times 1 瓶 | |
| | 样品稀释液 | 10 mL \times 1 瓶 | |
| | 抗体稀释液 | 5 mL \times 1 瓶 | |
| | 显色液 | 5 mL \times 1 瓶 | |
| | 终止液 | 3 mL \times 1 瓶 | |
| | 封板膜 | 3 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 $^{\circ}$ C 储存, 盒 2 于 2-8 $^{\circ}$ C 储存, 避免强光直射。

2. 预制酶标板拆封使用后，应将剩余预制酶标板密封，在 2-8℃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. 实验前准备

- 1.1. 将试剂盒从冷藏环境中取出，放置室温(18-28℃)平衡至少 30 min。
- 1.2. 配制 1×洗涤液：将浓缩洗涤液(20×)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×)用 190 mL 去离子水或蒸馏水稀释。
- 1.3. 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(3μg/mL)稀释 1000 倍后为标准品的第一个点(3ng/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(3μg/mL)稀释 500 倍后为标准品的第一个点(6ng/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 |
|-------------------------|--------------|-------------|
| 1μL 的 3μg/mL 的标准品母液 | 999μL 的样品稀释液 | 3ng/mL |
| 500μL 的 3ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 1.5ng/mL |
| 500μL 的 1.5ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 0.75ng/mL |
| 500μL 的 0.75ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 0.375ng/mL |
| 500μL 的 0.375ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 0.187ng/mL |
| 500μL 的 0.187ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 0.093ng/mL |
| 500μL 的 0.093ng/mL 的标准品 | 500μL 的样品稀释液 | 0.047ng/mL |
| 500μL 的样品稀释液 | 空管(对照孔) | 0ng/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 |

- 1.4. 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，假设配制 1.7mL，则需要取 4μL 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. 检测步骤

- 2.1. 酶标板孔排列：根据实验量从铝箔袋中取出相应数量板条，剩余的板条放回铝箔纸中密封好，2-8℃保存。

- 2.2. 加样：在酶标板中每孔加入 100 μ L 样品/标准品，用封板膜封板后，放入 37 $^{\circ}$ 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。）
- 2.3. 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 300 μ L 1 \times 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。
- 2.4. 加检测抗体：以每孔 100 μ L 加样量加入 1 \times 检测抗体，用封板膜封板后，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱孵育 1h。
- 2.5. 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 300 μ L 1 \times 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。
- 2.6. 按每孔 100 μ L TMB 显色液加入酶标板，用封板膜封板后，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱避光孵育 25min。
- 2.7. 终止/读值：每孔加入 50 μ L 终止液，轻轻混匀后用酶标仪检测各孔在 450nm 单波长处 OD 值（建议用双波长 450nm/630nm），15min 内完成读值。

结果分析

- 标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。
- 以标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标准曲线。如有设置复孔，则应取其平均值计算。检测时，标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.99$ ，否则实验无效。
- 将样品的 OD 值代入标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 值高于标准曲线上限，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标准曲线，以理论浓度标准品绘制的标准曲线如图 1 所示。

| dsRNA 浓度 (ng/mL) | OD _{样本} -OD _{对照孔} |
|---------------------|-------------------------------------|
| 3 | 2.787 |
| 1.5 | 1.732 |
| 0.75 | 0.966 |
| 0.375 | 0.503 |
| 0.1875 | 0.255 |
| 0.09375 | 0.143 |
| 0.046875 | 0.055 |
| 0 | 0 |

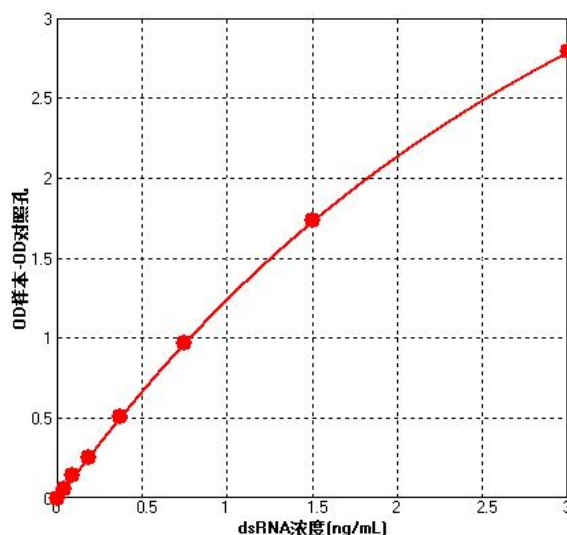


图 1 dsRNA 标准品（无修饰 UTP）的标准曲线

产品性能

- 精密度：板内变异系数 $<10\%$ ；板间变异系数 $<15\%$ 。
- 准确度：80%-120%。
- 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、酸碱或乙醛等高浓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。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, 其余未用板条需放回铝箔袋内于 2-8℃储存。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, 操作中需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。