

dsRNA ELISA 检测试剂盒说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-DS001

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心法原理，并偶联生物素-链霉亲和素系统，用于定量检测样本中双链 RNA(dsRNA) 含量，检测的 dsRNA 长度 60 bp 及以上，检测的 dsRNA 与其核酸序列无关。酶标板微孔中包被抗 dsRNA 抗体，加入样本后孵育洗涤，再加入生物素化检测抗体孵育，形成抗体-抗原-抗体复合物，再次洗涤后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记链霉亲和素 (streptavidin, SA)。经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色，TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，经酸的终止作用转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中 dsRNA 含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，根据标准曲线计算样品中 dsRNA 浓度。

(1) 检测范围：

无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0156-1pg/ μ L

N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0312-2pg/ μ L

5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0625-4pg/ μ L

(2) 检测限：

无修饰、pUTP 修饰、N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 检测限 0.001pg/ μ L

5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 检测限 0.01pg/ μ L

(3) 定量限：

无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0156pg/ μ L

N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0312pg/ μ L

5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0625pg/ μ L

(4) 精密度：CV% \leq 10%

(5) 回收率：80%~120%

规格

96 T

用途

适用于定量检测样本中 dsRNA 的含量。

备注：检测抗体、酶结合物、标准品 -18 $^{\circ}$ C 保存，其他组分 2~8 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒组成

组分	规格	配制
包被酶标板 (Coated Plate)	8×12 条	即用型
生物素化检测抗体 (100× Detec Antibody)	120μL×1 管	用稀释液作 100 倍稀释
HRP- 链霉亲和素 (100× Streptavidin-HRP)	120μL×1 管	用稀释液作 100 倍稀释
稀释液 (Diluent Buffer)	30mL×1 瓶	即用型
显色液 (TMB Substrate)	12mL×1 瓶	即用型
终止液 (Stop Solution)	6mL×1 瓶	即用型
20× 洗涤液 (20× Wash Buffer)	40mL×1 瓶	用纯水按 1: 19 体积比稀释成洗涤工作液
无修饰 dsRNA 标准品 (No modification Standard ,5ng/μL)	15μL×1 管	用 STE buffer 稀释至所需浓度
PUTP 修饰 dsRNA 标准品 (pUTP modification Standard , 5ng/μL)	15μL×1 管	用 STE buffer 稀释至所需浓度
N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 标准品 (N1-Me-pUTP modification Standard , 5ng/μL)	15μL×1 管	用 STE buffer 稀释至所需浓度
5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 标准品 (5-OMe-UTP modification Standard , 5ng/μL)	15μL×1 管	用 STE buffer 稀释至所需浓度
STE缓冲液 (STE buffer)	50mL×1 瓶	即用型
封板膜 (Sealer Film)	5 张	即用型
说明书	1 份	即用型

备注：试剂盒保存温度为 2~8℃。

储存条件与有效期

未开封的试剂盒，2~8℃条件下有效期为 12 个月。

需自行准备的材料：

- ◆ 酶标仪
- ◆ 去离子水
- ◆ 微孔板恒温振荡器
- ◆ 全新滤纸
- ◆ 微量加液器及吸头
- ◆ 涡旋振荡器

实验前准备

- (1) 将本次实验所用试剂平衡至室温 (18~25° C)。
- (2) 20× 浓缩洗涤液用纯化水按 1: 19 体积比稀释成洗涤工作液。
- (3) 将抗体管、HRP-SA 管和标准品管 1000 rpm 在使用前离心 30s，以避免管壁及管盖上残留试剂。
- (4) 将 100× 生物素化检测抗体和 100×HRP- 链霉亲和素在使用前用稀释液作 100 倍稀释后使用。
- (5) 无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 标准品用 STE buffer 稀释至 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0312、0.0156、0 pg/μL。
N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 标准品用 STE buffer 稀释至 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0312、0 pg/μL。
5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 标准品用 STE buffer 稀释至 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 pg/μL

标准品稀释方法建议如下：

a) . 无修饰、pUTP 修饰

编号	终浓度 (pg/μL)	稀释方法	
		STE buffer	工作标准品
	100	49 μL	1μL 5 ng/μL 标准品
A	1	495 μL	5μL 100 pg/μL 溶液
B	0.5	250 μL	250μL A 溶液
C	0.25	250 μL	250μL B 溶液
D	0.125	250 μL	250μL C 溶液
E	0.0625	250 μL	250μL D 溶液
F	0.0312	250 μL	250μL E 溶液
G	0.0156	250 μL	250μL F 溶液
H	0	250 μL	/

b) . N1-Me-pUTP 修饰

编号	终浓度 (pg/μL)	稀释方法	
		STE buffer	工作标准品
	100	49 μL	1μL 5 ng/μL 标准品
A	2	490 μL	10μL 100 pg/μL 溶液
B	1	250 μL	250μL A 溶液
C	0.5	250 μL	250μL B 溶液
D	0.25	250 μL	250μL C 溶液
E	0.125	250 μL	250μL D 溶液
F	0.0625	250 μL	250μL E 溶液
G	0.0312	250 μL	250μL F 溶液
H	0	250 μL	/

c) . 5-OMe-UTP 修饰

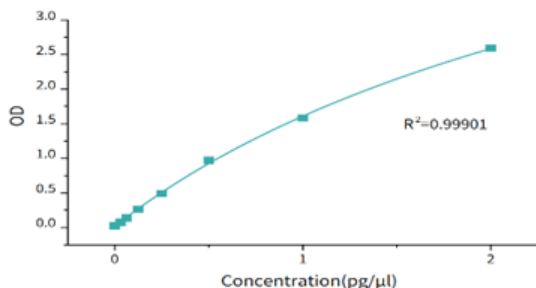
编号	终浓度 (pg/μL)	稀释方法	
		STE buffer	工作标准品
	100	49 μL	1μL 5 ng/μL 标准品
A	4	480μL	20μL 100 pg/μL 溶液
B	2	250 μL	250μL A 溶液
C	1	250 μL	250μL B 溶液
D	0.5	250 μL	250μL C 溶液
E	0.25	250 μL	250μL D 溶液
F	0.125	250 μL	250μL E 溶液
G	0.0625	250 μL	250μL F 溶液
H	0	250 μL	/

实验步骤

- (1) 从室温 (18-25°C) 平衡后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条加盖封板膜后用自封袋密封放回 2~8°C。
- (2) 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加入不同浓度的标准品 100μL, 样本孔中加入待测样本 100μL。
- * 当不能够确定待测样品中的 dsRNA 含量时, 应当用 STE buffer 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) 用封板膜封住反应孔, 室温 (18-25°C) 下振板 (500rpm) 反应 60min。
- (4) 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液 (250μL), 静置 30s, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 4 次。
- (5) 标准品孔和样本孔中每孔加入工作浓度的生物素化检测抗体 100μL, 用封板膜封住反应孔, 室温 (18-25°C) 下振板 (500rpm) 反应 60min。
- (6) 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液 (250μL), 静置 30s, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 4 次。
- (7) 标准品孔和样本孔中每孔加入工作浓度的 HRP- 链霉亲和素 100μL, 用封板膜封住反应孔, 室温 (18-25°C) 下振板 (500rpm) 反应 30min。
- (8) 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液 (250μL), 静置 30s, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 4 次。
- (9) 每孔加入单组分底物显色液 100μL, 用封板膜封住反应孔, 室温 (18-25°C) 静置避光反应 30min。
- (10) 每孔加入终止液 50μL, 立即进行检测, 设定酶标仪波长于 450nm 处 (建议用双波长 450nm/650nm)。

结果处理

标准曲线



实验检测结果

抗原浓度 (pg/μL)	N1-Me-pUTP 修饰标准品		
	OD (1)	OD (2)	平均值
2	2.8412	2.7362	2.7887
1	1.8725	1.9135	1.8930
0.5	1.0863	1.1207	1.1035
0.25	0.623	0.6055	0.6143
0.125	0.3388	0.3292	0.3340
0.0625	0.1947	0.1885	0.1916
0.0312	0.1192	0.1247	0.1220
0	0.0567	0.0518	0.0543

注意事项

1. 显色温度和时间对实验结果至关重要，应准确把握。
2. 洗涤过程中应使洗涤液浸泡反应板 30s 后再甩干，以充分洗涤非特异性吸附的成分。
3. 所有试剂使用前应充分摇匀，加样时应将所加样品加入酶标板孔中底部，避免加在孔壁上部，加样时注意不可溅出，不可产生气泡。
4. 若发现浓缩洗涤液中有结晶，可在 37°C 水浴锅中孵育，待结晶完全溶解后再混匀稀释至工作浓度。
5. 样本中应避免引入叠氮化钠 (NaN₃)，叠氮化钠会破坏辣根过氧化物酶活性，使检测值偏低。
6. 实验操作过程中要严格避免 RNase 污染。
7. 不可使用摇床代替振板机，若无振板机可采用室温 (18-25°C) 静置孵育，但静置孵育会造成检测灵敏度下降一倍左右。建议无修饰、pUTP 修饰标准品从 2pg/μL 开始稀释，N1-Me-pUTP 修饰标准品从 4pg/μL 开始稀释，5-OMe-UTP 修饰标准品从 8pg/μL 开始稀释，HRP-SA 孵育时长由 30min 调整至 60min。

免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

