

dsRNA 定量检测试剂盒(ELISA 法)



成为世界一流的特种酶产品与服务提供商
info@hzymes.com
www.hzymes.com

说明书版本号: V1.6

货号

货号	规格
HBP003800	48T
HBP003801	96T

产品概述

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。

产品性质

本试剂盒用于定量检测样本中 dsRNA 的含量。

运输及保存方法

1. 试剂盒于 2~8°C 储存，避免强光直射，有效期 12 个月。
2. 包被条拆封使用后，应将剩余包被条密封，在 2~8°C 储存，在有效期内使用。
3. 试剂盒其他组分使用后要及时放回 2~8°C 条件，在有效期内使用。

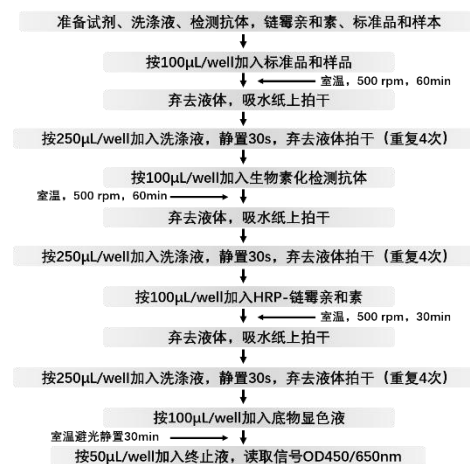
试剂盒组成

	组分	HBP003800	HBP003801
1	反应板	8 × 6 孔	8 × 12 孔
2	生物素化检测抗体(100x)	60μL	120μL
3	HRP-链霉亲和素(100x)	60μL	120μL
4	稀释液	15mL	30mL
5	显色剂	6mL	12mL
6	终止液	3mL	6mL
7	浓缩洗涤液(20x)	20mL	40mL
8	dsRNA 标准品(无修饰, 5ng/μL)	7.5μL	15μL
9	dsRNA 标准品(pUTP 修饰, 5ng/μL)	7.5μL	15μL
10	dsRNA 标准品(N1-Me-pUTP 修饰, 5ng/μL)	7.5μL	15μL
11	dsRNA 标准品(5-O-Me-UTP 修饰, 5ng/μL)	7.5μL	15μL
12	STE buffer	25mL	50mL
13	封板膜	2 张	4 张
14	说明书和 COA	各 1 份	各 1 份

所需仪器和试剂

1. 酶标仪(含 450nm 波长，建议含有双波长检测模式，主副波长分别为 450nm 和 650nm)。
2. 微孔板摇床
3. RNase-free 枪头和 EP 管

检测流程图



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 pg/μL。5-O-Me-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。稀释方法建议如下：
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	49μL	1μL 5ng/μL 标准品
A	1	495μL	5μL 100pg/μL 溶液
B	0.5	250μL	250μL A 溶液
C	0.25	250μL	250μL B 溶液
D	0.125	250μL	250μL C 溶液
E	0.0625	250μL	250μL D 溶液
F	0.0312	250μL	250μL E 溶液
G	0.0156	250μL	250μL F 溶液
H	0	250μL	/

N1-Me-pUTP 修饰

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

5-O-Me-UTP 修饰

编号	终浓度 (pg/μL)	稀释方法	
		STE buffer	工作标准品
	100	49μL	1μL 5ng/μL 标准品
A	4	480μL	20μL 100pg/μL 溶液
B	2	250μL	250μL A 溶液
C	1	250μL	250μL B 溶液

D	0.5	250μL	250μL C 溶液
E	0.25	250μL	250μL D 溶液
F	0.125	250μL	250μL E 溶液
G	0.0625	250μL	250μL F 溶液
H	0	250μL	/

检测步骤

1. 从室温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)。

检测结果的解释

1. 取标准品、空白对照、样本的平均光吸收值，减去空白对照的平均光吸收值，得到标准品、样品的光吸收校准值。以标准品浓度为横坐标，校准后的标准品光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。(双波长检测模式下的光吸收值为 450nm 减去 650nm)
2. 推荐使用专业的曲线制作软件，如 curve expert 1.3 或 ELISA Calc (请使用 Logistic 五参数或四参数拟合曲线计算方法绘制标准曲线)等。

检测性能

1. 检出限：

无修饰、pUTP 修饰、N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 检出限 ≤ 0.001pg/μL，5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 检出限 ≤ 0.01pg/μL。

2. 定量限：

无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0156pg/μL，N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0312pg/μL，5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 定量限 0.0625pg/μL。

3. 精密度：

板内变异系数 ≤ 10%，板间变异系数 ≤ 10%

4. 回收率：

80%~120%

5. 线性范围：

无修饰、pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0156-0.5pg/μL，N1-Me-pUTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0312-1pg/μL，5-OMe-UTP 修饰 dsRNA 检测线性范围 0.0625-1pg/μL。

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。若出现按常规操作流程，测值超出仪器可检测范围现象，可适当减少显色时间。
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，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。

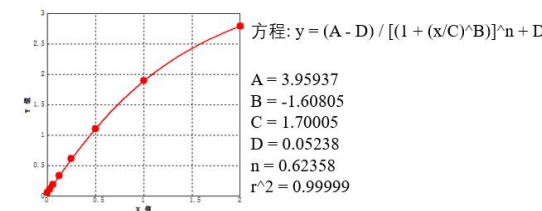
检测实例

1. 标曲测值

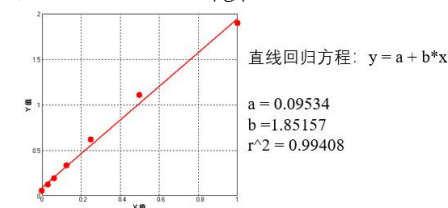
抗原浓度 (pg/μl)	N1-Me-pUTP 修饰标准品		
	OD450-OD650(1)	OD450-OD650(2)	AVERAGE
2	2.8412	2.7362	2.7887
1	1.8725	1.9135	1.8930
0.5	1.0863	1.1207	1.1035
0.25	0.623	0.6055	0.6143
0.125	0.3388	0.3292	0.3340
0.0625	0.1947	0.1885	0.1916
0.0312	0.1192	0.1247	0.1220

0	0.0567	0.0518	0.0543
---	--------	--------	--------

2. 标曲五参数 Logistic 曲线拟合



3. 线性范围判断: 0.0312-1pg/μL



抗原浓度 (pg/μl)	OD450-OD650
1	1.8930
0.5	1.1035
0.25	0.6143
0.125	0.3340
0.0625	0.1916
0.0312	0.1220

4. 样品测值

	上样浓度	OD450-OD	dsRNA 浓度 (代入标曲)	结果判断
M6	2ng/μl	2.3952	1.46	无效
	1989ng/μL	0.5ng/μl	1.1036	0.50
M13	0.1ng/μl	0.3252	0.12	有效
	2ng/μl	2.0294	1.11	无效
1394ng/μL	0.5ng/μl	0.7030	0.29	有效
	0.1ng/μl	0.1936	0.06	有效