

Vaccinia Capping Enzyme ELISA Kit

牛痘病毒加帽酶检测试剂盒

产品简介

真核生物中 mRNA 经转录后修饰在 5'端形成一个特殊结构，即帽子结构，该结构对 mRNA 的稳定、转运与翻译过程均有较重要作用。牛痘病毒加帽酶是催化形成帽子结构的有效酶，其由 D1 和 D12 两个亚基组成，兼具 RNA 三磷酸酯酶活性、鸟苷酰基转移酶活性和鸟嘌呤甲基转移酶活性，可将 7-甲基鸟嘌呤帽结构 (m7Gppp) 连接到 RNA 的 5'末端 (m7Gppp5'N)。牛痘病毒加帽酶，在合适浓度的加帽缓冲液 (Capping buffer)，鸟苷三磷酸 (GTP)，S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 等存在条件下，能够在一个小时之内对 RNA 进行加帽，并且保证正确的方向。

本试剂盒应用双抗夹心酶联免疫检测 (ELISA) 的实验原理进行牛痘病毒加帽酶残留量检测，将牛痘病毒加帽酶标准品和待测样本加入预包被抗牛痘病毒加帽酶抗体的酶标板 (36709-A)，然后加入稀释后的生物素标记的牛痘病毒加帽酶检测抗体 (36709-C)，最后加入 Streptavidin-HRP (SA-HRP) (36709-D)，形成抗体+抗原+抗体 - Biotin+ SA - HRP 复合物，洗板后加入 TMB 显色液 (36709-H) 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下由无色转化成蓝色并在终止液 (36709-I) 的作用下最终转化成黄色。黄色的深浅与样本中被检测到的牛痘病毒加帽酶的量呈正相关。

产品信息

货号	36709ES48 / 36709ES96
规格	48 T / 96 T

组分信息

组分编号	组分名称	36709ES48	36709ES96
36709-A	Anti-Vaccinia Capping Enzyme coated microtiter strips	48 T	96 T
36709-B*	Standard: Vaccinia Capping Enzyme	1 vial	2 vial
36709-C	Detection Antibody: Biotin-conjugated Antibodies	60 μ L	120 μ L
36709-D	Streptavidin-HRP	20 μ L	40 μ L
36709-E	Dilution Buffer 1	25 mL	45 mL
36709-F	Wash Buffer Concentrate (20 \times)	25 mL	50 mL
36709-G	Dilution Buffer 2	15 mL	30 mL
36709-H	TMB Substrate	8 mL	15 mL
36709-I	Stop Solution	5 mL	10 mL
36709-J	Plate Sealer	3 each	5 each

*标准品 36709-B 为冻干粉。

储存条件

2~8 $^{\circ}$ C保存，未拆封有效期 1 年，拆封后有效期 1 个月。

*收到货后，请检查各组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

使用说明

1. 实验前准备

1) 本试剂盒未提供但实验所需的实验材料:

- a. 量筒、1000mL 烧杯、不同规格的 EP 管
- b. 无尘纸 (用于洗板后拍板)
- c. 无菌吸头
- d. 样本前处理板
- e. 去离子水或双蒸馏水

2) 本试剂盒未提供但实验所需的实验设备和仪器:

- a. 37°C恒温箱
- b. 全自动洗板机
- c. 旋涡混匀仪、离心机
- d. 不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器
- e. 计时器、4°C冰箱
- f. 酶标仪 (如: Molecular Devices: M 和 i 系列) 在 450 nm 测量吸光度(参比波长 630 nm)

2. 实验方法

1) 试剂、抗体准备

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。

a. 1×Wash Buffer 配制:

浓缩液平衡至室温,充分溶解,不要有结晶。混匀后根据所需的量,用超纯水按 1:20 的比例,将浓缩洗液 (20×) 稀释 20 倍,最终得到 1×洗液。如:取 50 mL 的浓缩洗液 (20×) 加入 950 mL 的去离子水中配成 1000 mL 1×洗液。如果浓缩洗液 (20×) 中出现结晶,在 50°C 的水浴锅中温浴,直至结晶完全消失。

b. Detection Antibody 配制:

使用前 10000 rpm 离心 20s,然后用 Dilution Buffer 2 将检测抗体以 1: 100 稀释至工作浓度使用。

c. Streptavidin-HRP 配制:

使用前 10000 rpm 离心 20s,然后用 Dilution Buffer 2 以 1: 500 稀释至工作浓度使用。

2) 标准品溶液制备

提前准备 8 个 1.5mL 离心管,按照标准品浓度依次进行标记。取一支标准冻干品用 Dilution Buffer 1 按标签标示量溶解,静置 10 分钟左右轻柔地混匀,溶解后浓度为 32 ng/mL。第一个离心管中加入 450μL Dilution Buffer 1,其余各离心管分别加入 300μL Dilution Buffer 1,先取 150μL 溶解混匀的 32 ng/mL 标准品,加至第一个离心管中充分混匀后即标记其为 8 ng/mL,再取 300μL 至下一个标记浓度的离心管中,充分混匀,进行一系列 2 倍梯度稀释,起始最高浓度标记为 8 ng/mL,最低浓度为 0.125 ng/mL,可按照下面的配制方法来进行。每次试验均需制备相应的标准曲线,不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时,每个孔所需标准品量为 100μL,注意配制体积要高于所需体积,避免使用量不足。

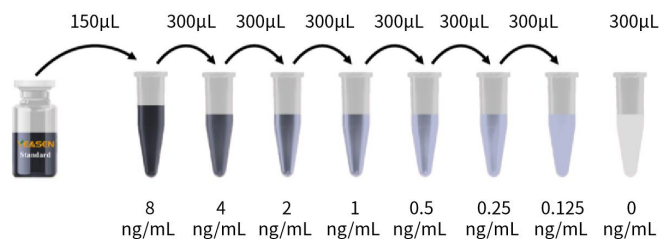


图 1 Vaccinia Capping Enzyme 标准品制备流程图

管号	Dilution Buffer 1 体积 (μL)	加入的标准品和体积 (μL)	标准品终浓度 (ng/mL)
A	450	150 (32 ng/mL)	8
B	300	300 A	4
C	300	300 B	2
D	300	300 C	1
E	300	300 D	0.5
F	300	300 E	0.25
G	300	300 F	0.125
H	300	0	0

表 1 Vaccinia Capping Enzyme 标准品体系配制 (酶标仪检测 0-8 ng/mL)

3) 待测样本制备

将样本按照一定的稀释倍数进行稀释。样本具体的稀释倍数，需要通过样本加标，评估加标回收率和稀释线性后，确定合适的稀释倍数。

4) 实验步骤

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行双复孔测定。

- a. 试剂准备：提前准备好各种待测试剂、稀释好的标准品和待测样本。
- b. 酶标板条确定：计算待测样本和标准品所需酶标板条，将酶标条从铝箔袋取出，剩余的酶标条放回铝箔袋中并封好袋口，低温保存。
- c. 浸泡酶标板：加入 1×Wash Buffer (300 μL/孔) 浸泡酶标板，静置 30 秒后弃去孔中液体，拍干酶标板。洗板对试验结果有重要影响，确保最后一次拍板没有洗液残留。
- d. 孵育样本：加入标准品和待测样本，100 μL/孔，确保 15 min 内完成点样，37°C 孵育 1 h。
- e. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 μL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。
- f. Biotin-conjugated Antibodies 孵育：将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板中，100 μL/孔，37°C 孵育 1 h。
- g. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 μL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。
- h. Streptavidin-HRP 孵育：将预先配制至工作浓度的 Streptavidin-HRP 加入酶标板中，100 μL/孔，37°C 孵育 40 min。
- i. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 μL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。
- j. 显色：使用前 10 min 将底物液恢复至室温，将底物液 TMB 加入酶标板中，100 μL/孔，37°C 避光孵育 15 min。
- k. 终止：加入 50 μL/孔终止液至酶标板中，轻轻震动酶标板至显色均匀。
- l. 读值：20 min 内读取 450nm/630nm 波长处的吸光度值。450nm 作为检测波长，630nm 作为参比波长。

5) 结果分析

- a. 如果待测样本 OD 值超出标准曲线最高点 OD 值，需将样本进行稀释后重新测定。
- b. 曲线制定：以标准品浓度为横坐标，校准后的标准品吸光度值 (OD_{450nm-630nm}) 为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往曲线拟合效果较好，其它方法如线性，双对数法也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。最终依据标准曲线和样本的稀释倍数计算样本中残留蛋白浓度。
- c. 典型的参考标准曲线如下 (以下标准曲线图仅供参考，应以同次实验标准品所绘标准曲线计算样本含量)：

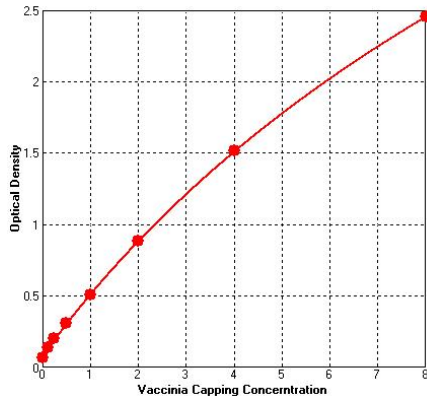


图 2: 典型标准曲线图

标曲 (ng/mL)	OD	平均 OD	校准值
8	2.455	2.374	2.455
4	1.517	1.457	1.513
2	0.886	0.828	0.887
1	0.505	0.492	0.515
0.5	0.310	0.286	0.307
0.25	0.205	0.190	0.195
0.125	0.135	0.128	0.135
0	0.066	0.065	0.072

表 2 典型标准曲线数据

6) 实验流程图



图 3: 实验步骤流程简图

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估, 具体可联系翊圣技术人员获取相应的性能验证报告。

注意事项

- 1) 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书；
- 2) 请在有效期内使用该产品，禁止不同批次的相关试剂进行混用；
- 3) 所有试剂在使用之前，均需要恢复至室温；
- 4) 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性；
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6) 本产品仅用作科研用途。