Vazyme

www.vazyme.com

Vazyme

Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com
Tel: +86-400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com

2'-O-Methyltransferase 定量检测试剂盒

DD3503

Vazyme

使用说明书

Version 22.3

Vazyme

目录 Contents

01/预期用途 …… 02
02/检验原理 …… 02
03/主要组成成分 …… 02
04/储存条件及有效期 …… 03
05/检验方法 …… 03
05-1/实验准备 …… 03
05-2/实验操作 …… 04
06/简明操作程序 …… 05
07/结果判定 …… 05
08/产品性能指标 …… 06
08-1/灵敏度 …… 06
08-2/精密度 …… 06
08-3/回收率 …… 06
09/注意事项 …… 06

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/预期用途

本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫法检测mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase的残留。

02/检验原理

mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(2'氧甲基转移酶)为重组E.coli表达的牛痘病毒DNA编码的一种甲基转移酶。该酶利用S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine,SAM)为甲基供体，在RNA 5'端紧邻帽结构(Cap0)的第一个核苷酸的2'-O位点添加甲基基团，形成带有Cap1结构的mRNA。Cap1结构能够增强mRNA的翻译效率，并且降低mRNA结构本身的免疫原性，因此有助于改善mRNA转染后编码蛋白的表达水平。2'氧甲基转移酶能够特异性识别7-甲基鸟苷帽结构(m7GpppN，Cap0)，不会作用于5'端为pN，ppN，pppN或GpppN的RNA。

本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫法(夹心ELISA)检测2'氧甲基转移酶的含量，用抗2'氧甲基转移酶的单克隆抗体包被微孔板，形成固相抗体，向固相抗体微孔板中加入2'氧甲基转移酶标准品和待测样品，经过洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的抗2'氧甲基转移酶单克隆抗体，形成“包被抗体-抗原-酶标检测抗体”复合物，经过洗涤后加入显色液显色，显色液在辣根过氧化物酶的催化下转化成蓝色并在酸的作用下最终转化成黄色，颜色的深浅与样品中2'氧甲基转移酶的含量呈正相关。

03/主要组成成分

	组 分	规 格
BOX 1	1. 2'-O-Methyltransferase标准品(8,000 ng/ml)	100 μl
BOX 2	2. 预制酶标板(包被anti-2'-O-Methyltransferase的单克隆抗体)	12 × 8孔，96孔
	3. 样品稀释液	2 × 30 ml
	4. 酶标检测抗体稀释液	12 ml
	5. 酶标检测抗体(100 ×)	120 μl
	6. 浓缩洗涤液(20 ×)	30 ml
	7. 显色液	12 ml
	8. 终止液	6 ml
	9. 封板膜	3张
	10. 说明书	1册

说明：本试剂盒不可与其他商品化试剂盒混用，本试剂盒不同批次间各对应组分请勿混用。

试剂盒之外需要准备的试剂与器材：

> 去离子水
> 加样槽
> 废液缸
> 读板器或酶标仪
> 微孔板混匀器
> 洗板机
> 恒温箱
> 计时器
> 移液器与配套灭菌枪头
> 一次性手套
> 吸水纸

04/储存条件及有效期

1.DD3503：BOX 1，-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输；
BOX 2，2 ~ 8℃保存，根据不同目的地调整运输方式。切勿冷冻，避光保存。

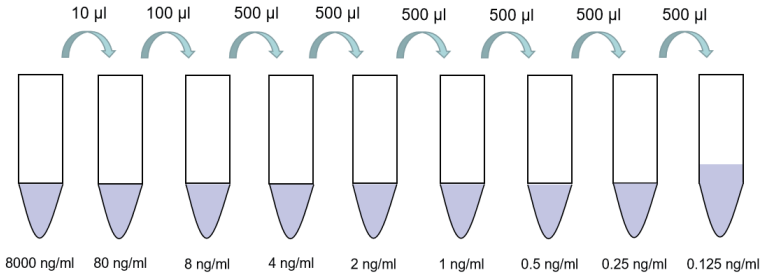
2.生产日期及失效期见标签，有效期12个月。

05/检验方法

05-1/实验准备

1. 将试剂盒及标准品从冷藏环境中取出，放置室温(18 ~ 28℃)平衡至少30 min。
2. 1 × 洗涤液配制：将20 × 浓缩洗涤液用去离子水或蒸馏水20倍稀释，混匀备用。例如30 ml 20 × 浓缩洗涤液用570 ml去离子水或蒸馏水稀释。
3. 按需要取出预制板条数，剩余未使用的条板尽快放入塑封袋，放还至2 ~ 8℃的储存条件。
4. 标准品的配制：取标准品原液(8,000 ng/ml)先稀释100倍后为80 ng/ml的浓度，然后再稀释10倍为标准曲线的第一个点(8 ng/ml)，再2倍梯度稀释成4、2、1、0.5、0.25、0.125 ng/ml。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。

▲标准品初次使用后请分装保存



移取	加入至	配成2'-O-Methyltransferase浓度
10 µl的8,000 ng/ml的标准品	990 µl的样品稀释液	80 ng/ml
100 µl的80 ng/ml的标准品	900 µl的样品稀释液	8 ng/ml
500 µl的8 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	4 ng/ml
500 µl的4 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	2 ng/ml
500 µl的2 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	1 ng/ml
500 µl的1 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	0.5 ng/ml
500 µl的0.5 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	0.25 ng/ml
500 µl的0.25 ng/ml的标准品	500 µl的样品稀释液	0.125 ng/ml
500 µl的样品稀释液	空管	0 ng/ml

5. 1 × 酶标检测抗体的配制：将100 µl 100 × 酶标检测抗体加入9.9 ml酶标检测抗体稀释液中，上下颠倒混匀至少30次，制备成1 × 酶标检测抗体工作液。

05-2/实验操作

1. 加样：先在酶标板中每孔加入100 µl样品/标准品。
▲待测样品需用样品稀释液至少稀释5倍。
2. 孵育：用封板膜封板后，放入37℃恒温培养箱孵育1 h。
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 µl 1 × 洗涤液，静置浸泡30 s，连续洗板4次，最后一次尽量去除残留液体。
4. 加酶标检测抗体工作液：按每孔100 µl加样量加入1 × 酶标检测抗体工作液。
5. 孵育：用封板膜封板后，放入37℃恒温培养箱孵育1 h。
6. 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 µl 1 × 洗涤液，静置浸泡30 s，连续洗板4次，最后一次尽量去除残留液体。
7. 显色：按每孔100 µl加样量将显色液加入酶标板，用封板膜封板后，放入37℃恒温培养箱避光孵育10 min。
8. 终止/读值：每孔加入50 µl终止液，轻轻混匀，10 min内读值。用酶标仪检测各孔在450 nm单波长处吸光值。

06/简明操作程序

每孔加入100 μl样品/标准品

↓ 37℃温育1 h

用1 × 洗涤液按300 μl/孔洗板4次，拍干孔中液体，每孔加入100 μl 1 × 酶标检测抗体

↓ 37℃温育1 h

用1 × 洗涤液按300 μl/孔洗板4次，拍干孔中液体

↓

每孔加入显色液100 μl

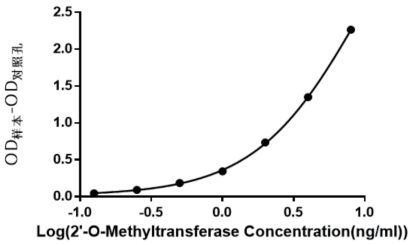
↓ 37℃温育10 min

每孔加入终止液50 μl混匀，检测450 nm处吸光值

07/结果判定

1. 将所测得的标准品孔OD值扣除对照孔OD值，以标准品的浓度取对数为横坐标，OD值为纵坐标，采用四参数拟合绘制标准曲线。如有设置复孔，则应取其平均值计算。
2. 将样品孔所测得的OD值扣除对照孔OD值后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。最低定量限(LOQ)=125 pg/ml，低于125 pg/ml报告为<125 pg/ml。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。此标准曲线仅用于示范，每次实验均应生成新的标准曲线。

2'-O-Methyltransferase 浓度（ng/ml）	$OD_{样本}$-$OD_{对照孔}$
8	2.2657
4	1.3509
2	0.7372
1	0.3445
0.5	0.1865
0.25	0.0924
0.125	0.0473
0	0.0000
R^2	0.9999



08/产品性能指标

08-1/灵敏度

LOD	LOQ
<50 pg/ml	125 pg/ml

08-2/精密度

	分析内精密度			分析间精密度		
样品	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	30	30	30
平均值	3.79	0.84	0.21	3.93	0.91	0.23
SD	0.16	0.04	0.01	0.29	0.06	0.02
CV	4%	5%	5%	7%	6%	7%

08-3/回收率

样品(n=10)	测得浓度平均(ng/ml)	平均回收率%	回收率范围%
4 ng/ml	4.09	102	93 - 115
1 ng/ml	0.89	89	83 - 98
0.25 ng/ml	0.23	91	83 - 98

09/注意事项

1. 预制酶标板可拆卸，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。拆卸条板时，切勿碰触孔底，以免指纹、刮痕等影响之后的读值。洗板后，切勿放置太久以免干燥，需立即进行下一步操作。
2. 封板膜不可重复使用。
3. 各组分储存与用法请严格按照使用说明操作，切勿自行更改与稀释。
4. 在使用前，请严格检查试剂盒的效期与包装。如果效期超时或包装破损，请不要用于实验操作。
5. 使用前，所有试剂需要平衡至室温配制使用，之后需立即放还至2 ~ 8℃的低温条件，标准品放还至-30 ~ -15℃保存。
6. 加样品时，避免产生气泡，避免枪头触及板底，以免造成刮痕影响读值。
7. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。
8. 操作中须佩戴一次性手套和实验室规定的防护物品，检测后的废液和用具须按照当地政府和有关国家规定进行无害化处理。