

焦磷酸酶残留检测试剂盒

(酶联免疫分析法)

【产品名称】

焦磷酸酶残留检测试剂盒 (酶联免疫分析法)

【规格】

96 Tests

【货号】

RES-A005

【背景介绍】

无机焦磷酸酶(PPase)是一种用于蛋白质、RNA和DNA合成的酶。PPase催化焦磷酸盐的一个离子转化为两个磷酸离子,在任何含有Mg²⁺的反应体系中都能很好地发挥作用,例如RNA体外转录(IVT)。PPase作为一种蛋白质成分在IVT中使用时,需要检测其残基。

为支持 mRNA 药物的开发, ACROBiosystems 经过严格的方法学验证,自主研发出 Pyrophosphatase ELISA 残留检测试剂盒,可用于定量检测 mRNA 药物中 Pyrophosphatase 残留含量,在药物开发及 CMC 质控阶段对 mRNA 药物质量进行评价。

【检测原理】

本试剂盒应用 ELISA 夹心法。微孔板预包被了 Anti-Pyrophosphatase Antibody, 样本中的 Pyrophosphatase 与微孔板上固定的 Anti-Pyrophosphatase Antibody 结合, 然后加入 Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody, 形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物, 最后加入 Streptavidin-HRP, 用底物显色, 随后用终止液终止, 板孔中溶液会由蓝色变为黄色, 使用酶标仪在 450 nm 和 630 nm 处测定样品吸光度值 (OD_{450 nm}、OD_{630 nm}), OD 值与样本中的焦磷酸酶含量呈正相关。

【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 请在试剂盒有效期内使用，不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
3. 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用样本稀释液稀释后重新检测；若细胞上清样本需分步稀释，除最后一步用稀释剂稀释外，其它中间稀释可采用细胞培养基；
4. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等；
5. 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
RES005-C01	Pre-coated Anti-Pyrophosphatase Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RES005-C02	Pyrophosphatase Standard	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES005-C03	Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody	15 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RES005-C04	Streptavidin-HRP	50 µL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES005-C05	20xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES005-C06	2xDilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES005-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES005-C08	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

【运输和储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装箱标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存贮条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用

2/13

完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：不要使用过期试剂。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 μ L、300 μ L、1000 μ L加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL
5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温（20°C-25°C）。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议分装规格不低于5 μ g，冻融次数不要超过1次。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度.	重构水体积Vol.
RES005-C03	Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody	15 μ g	100 μ g/mL	150 μ L

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1xWashing Buffer:

取50 mL 20xWashing Buffer，用超纯水/去离子水稀释并定容至1000 mL，轻轻混匀。

1.2 配制1xDilution Buffer:

取50 mL 2×Dilution Buffer，用1×Washing Buffer稀释并定容至100 mL。

1.3 配制Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody工作液：










用1×Dilution Buffer将Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody储存液稀释至0.25 μg/mL，需现用现配。

1.4 配制Streptavidin-HRP工作液：

用1×Dilution Buffer将Streptavidin-HRP进行2000倍稀释，该工作液避光保存，需现用现配。

2. 制备标准曲线

标准品（RES005-C02）的浓度为 200 μg/mL，取 10 μL 的标准品溶液，加入到 990 μL 的稀释液中（Std.-0），然后取 Std.-0 溶液 10 μL，加入到 990 μL 的稀释液中（Std.-1'），最后取 Std.-1' 溶液 10 μL，加入到 657 μL 的稀释液中，作为标准曲线的最高浓度 **Std.-1（300 pg/mL）**。在后续每一个离心管中加入 300 μL 稀释液，使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

Tubes/ Solution Code	Standard stock solution	Std.-0	Std.-1'	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6
Operating									
Solution Con.	200μg/mL	2000 ng/mL	20 ng/mL	300 pg/mL	150 pg/mL	75 pg/mL	37.5 pg/mL	18.75 pg/mL	9.38 pg/mL
Dilution Buffer Vol.		990 μL	990 μL	657 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL

3. 加样

将待测样品和系列稀释后的标准品加入反应孔内，每孔加入 100 μL 。空白对照孔加入 100 μL 1x Dilution Buffer。

注：待测样品和标准曲线建议设置复孔。

4. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

5. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300 μL 1xWashing Buffer，浸泡 10 s，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

6. 加 Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody 工作液

在对应板孔内加入 100 μL 稀释的 Biotin-Anti-Pyrophosphatase Antibody (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，该工作液现用现配。

7. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

8. 洗板

重复步骤 5 洗板。

9. 加 Streptavidin-HRP 工作液

在对应板孔内加入 100 μL 稀释的 Streptavidin-HRP (1:2000 稀释)，该工作液现用现配，避光保存。

10. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

11. 洗板

重复步骤 5 洗板。

12. 显色

每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温孵育 20 min。

13. 终止

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色完全变为黄色。

14. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 5 分钟内读数。

注：各孔 OD_{450 nm}扣除OD_{630 nm}读值可降低背景干扰。

【结果分析】

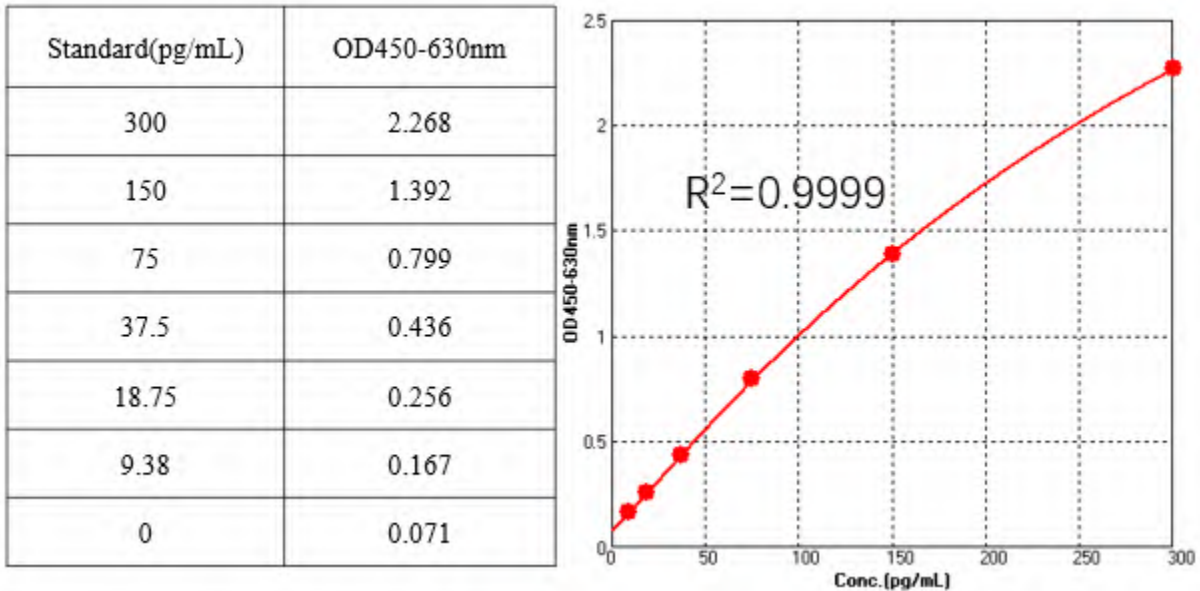
- a. 将标准品和样本的复孔读数求取平均值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。
- b. 以标准品的浓度作为横坐标，OD 值作为纵坐标，利用四参数拟合绘制标准曲线，进行样本浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
- c. 标准曲线 R² 应大于 0.9900。
- d. 标准曲线范围：9.38 pg/mL-300 pg/mL。大于分析标准曲线范围的样品应报告为大于 300 pg/mL 或稀释样品使其在线性范围内。小于分析标准曲线的样品应报告为小于 9.38 pg/mL。

【检测流程简述】



【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 OD 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，以下 Example 数据仅供参考。



【灵敏度】

Pyrophosphatase 的最低可检测浓度为 1.92 pg/mL(3 次独立实验的平均值)。20 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两倍 SD，计算最低可检测浓度。

【精密度】

a. 分析批内精密度

3 个已知浓度的样本分析批内重复测试 20 次，以评估分析批内的精密度。

b. 分析批间精密度

3 个已知浓度的样本分析批间重复测试 3 次，以评估分析批间的精密度。

样本	批内精密度			批间精密度		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	3	3	3
平均值(pg/mL)	256.617	66.092	10.434	251.710	64.829	10.044

标准差	14.745	3.085	0.785	5.921	3.090	0.635
变异系数(%)	5.7%	4.7%	7.5%	2.4%	4.8%	6.3%

注:示例数据仅供参考, 请以实际检测数据为准。

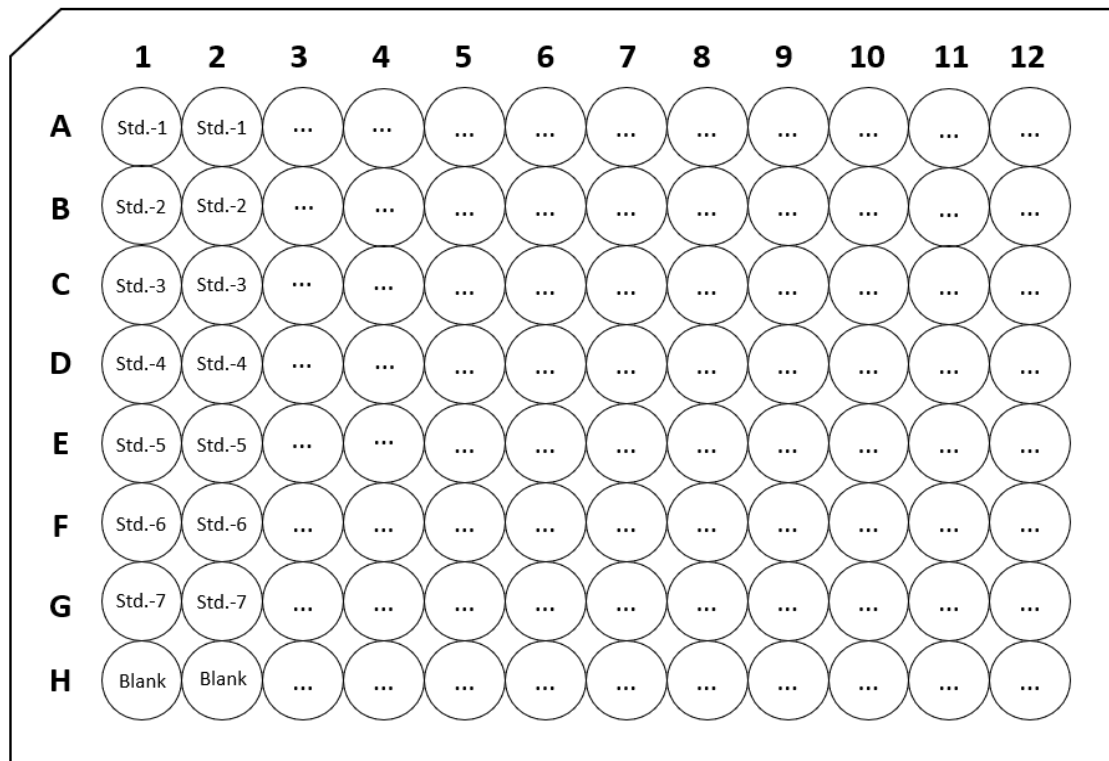
【准确度】

通过 3 个不同浓度的 Pyrophosphatase 进行测试, 计算回收率。

样品(n=3)	检测浓度(pg/mL)	平均检测浓度(pg/mL)	平均回收率%	回收率范围%
高	264.546	260.3	104.1	98.3-110.8
	245.664			
	258.914			
	277.036			
	246.825			
	269.024			
中	66.709	64.0	106.7	96.7-112.7
	58.041			
	67.631			
	62.240			
	65.444			
	64.068			
低	9.725	9.5	95.4	85.2-103.3
	8.520			
	10.329			
	9.022			
	9.524			
	10.128			

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



注：Blank为空白对照Dilution Buffer孔。

【实验过程中可能遇到的问题及解决方案】

问题	可能的原因	解决办法
1. 结果 OD 值非常低	(1) 孵育的时间或温度不够； (2) 显色反应时间太短； (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题； (4) 不正确的试剂储存方式或/和加入抗体/酶的工作液浓度太低； (5) 酶标仪滤光片不正确； (6) 不正确的试剂储存方式； (7) 试剂盒没有充分平衡； (8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂	a. 校正孵育箱温度； b. 校正定时钟准确定时； c. 使用新鲜合格的蒸馏水； d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液； e. 校正酶标仪； f. 保证各试剂在推荐储存温度下储存； g. 试剂室温平衡至少 15 分钟，确保所有试剂已平衡至室温（20-25℃）；

	<p>水太多或内壁不清洁；</p> <p>(9) 包袋中有湿气；</p> <p>(10) 试剂在使用前未混匀；</p> <p>(11) 洗涤步骤过于剧烈；</p> <p>(12) 实验开始后，微孔变干燥；</p>	<p>h. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用；</p> <p>i. 首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂；</p> <p>j. 使用前混匀试剂；</p> <p>k. 降低洗涤系统的压力；</p> <p>l. 实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤；</p>
<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于：</p> <p>(1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致；加错样本；温育时间、洗板、显色时间不一致；</p> <p>(2) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</p> <p>(3) 加样过快，孔间发生污染；</p> <p>(4) 试剂/样本没有混匀；</p> <p>(5) 样本中有杂质或沉淀物；血清样本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等；</p> <p>(6) 微孔中有气泡；</p> <p>(7) 倍比稀释标准品时未混匀；</p> <p>(8) 过早稀释</p>	<p>a. 重复测定样本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性；</p> <p>b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴；</p> <p>c. 加液时小心操作；</p> <p>d. 样本稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂；</p> <p>e. 使用前离心；</p> <p>f. 用针尖挑破气泡；</p> <p>g. 稀释标准品的每一步均需混匀；</p> <p>h. 标准品在快要使用时稀释；</p> <p>i. 每次须使用新的封板胶封住反应；</p> <p>j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中；</p> <p>k. 不混用不同批号试剂盒中组分；</p>

	<p>(9) 使用用过的封板胶纸</p> <p>(10) 加入的体积不正确</p> <p>(11) 不同批号试剂盒中组分混用;</p>	
<p>3. 空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净;</p> <p>(2) 试剂过期;</p> <p>(3) 洗涤不充分;</p> <p>(4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染;</p> <p>(5) 蒸馏水受酶等污染;</p> <p>(6) 试剂混用;</p> <p>(7) 试剂配制浓度有误, 如酶的浓度过高;</p> <p>(8) 孵育温度过高或反应时间过长;</p> <p>(9) 显色时间过长;</p> <p>(10) 底物在使用前曝光;</p> <p>(11) 读板前停留时间过长;</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制: 10xWashing Buffer 如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释;</p> <p>b. 使用保质期内试剂;</p> <p>c. 充分洗涤, 彻底拍干;</p> <p>d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用, 不要反复使用, 否则易造成污染; 吸嘴尽可能一次性使用;</p> <p>e. 使用新鲜蒸馏水;</p> <p>f. 不同批号试剂勿混用;</p> <p>g. 请按说明书所示稀释倍数配制;</p> <p>h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定;</p> <p>i. 显色反应时间适当缩短;</p> <p>j. 应保存在暗处, 避光;</p> <p>k. 加终止液后 10 分钟内读数;</p>
<p>4. 边缘效应</p>	<p>(1) 蒸发;</p> <p>(2) 温度不均匀;</p>	<p>a. 各步之间, 须使用封版胶密封反应板;</p> <p>b. 校准孵育箱, 勿叠放反应板;</p>

<p>5. 标准曲线良好，但样本无检测信号</p>	<p>(1) 样本中无检测物或检测物含量极低； (2) 样本中其他物质影响/掩盖检测； (3) 样本中检测物浓度过高， Hook 效应导致假低值。</p>	<p>a. 设置内参，重新实验； b. 作适当稀释，降低其他物质的干扰，或作系列稀释，检测回收率； c. 适当倍数稀释样本，检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。</p>
---------------------------	---	---