

QCdetect™ dsRNA ELISA Kit

Please read this instruction carefully before use.

1. Introduction

In vitro transcription (IVT) is a key step in the development of mRNA-based therapeutics, including mRNA vaccines. During this process, double-stranded RNA (dsRNA) is generated as an unintended byproduct. Because dsRNA is highly immunogenic, accurate measurement and quantification of residual dsRNA are essential in the manufacturing of mRNA-based pharmaceuticals and vaccines.

This product is an ELISA kit specifically designed to measure the concentration of dsRNA with high sensitivity. This kit is intended for research use only.

2. Assay Principle

Each well of the assay plate is pre-coated with anti-dsRNA antibody clone J2. Standards or samples are added to the wells and incubated. Next, biotin-conjugated anti-dsRNA antibody clone J2 is added and allowed to react. Peroxidase-conjugated streptavidin is then added and incubated. The peroxidase remaining in the wells is allowed to react with the TMB solution. The reaction is stopped by adding the Stop Solution, and the resulting yellow product is measured colorimetrically at 450 nm (reference wavelength : 620 nm). A calibration curve is generated by plotting absorbance against standard concentrations and used to determine the dsRNA concentration in each sample.

3. Performance Characteristics

Assay range	UTP : 7.7 pg/mL - 1,000 pg/mL m1ψ : 15.4 pg/mL - 2,000 pg/mL
Target Analyte	dsRNA
Analysis sample	Purified mRNA solution
Measurement duration	Approx. 4.5 hours
Detection Method	Colorimetric assay
Measurement Wavelengths	Primary wavelength : 450 nm Secondary wavelength : 620 nm

4. Precautions

1. Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) for approximately 2 hours before use.
2. Before beginning each step, prepare all reagents required for the next step.
3. For professional use only, beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
4. Avoid contact with the acidic Stop Solution and TMB Solution, which contains hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
5. Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. Especially be careful for the Stop Solution because it is sulfuric acid. The Stop Solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
6. Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
7. Unused samples and used tips should be rinsed in more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour, or be treated by an autoclave before disposal.
8. Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
9. Do not combine reagents from different lots.
10. In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a Plate Seal supplied, during incubation.
11. ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20°C - 25°C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30%.
12. Use the same type of tubes or deep well plates when preparing standard solutions and mRNA samples. Differences in material or surface treatment can affect RNA adsorption and influence measurement results. Always use the same containers and addition methods for each measurement.

5. Kit Contents

5-1. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells (8×12)/1 plate
(B) UTP dsRNA Standard	Concentrated. Use after dilution.	50 μ L/1 bottle
(C) m1 ψ dsRNA Standard	Concentrated. Use after dilution.	50 μ L/1 bottle
(D) Sample Reaction Buffer	Ready for use.	25 mL/1 bottle
(E) Antibody Reaction Buffer	Ready for use.	25 mL/1 bottle
(F) Biotin-conjugated Antibody	Lyophilized. Use after reconstitution.	1 bottle
(G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	120 μ L/1 bottle
(H) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(J) Wash Solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate Seal	Ready for use.	4 sheets

5-2. Storage and Stability

When using only a part of the kit, refer to the storage and stability information below for unused reagents.

(1) (A) Antibody-coated Plate

The plate can be used in individual strips.

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip-seal originally used for well-plate container and store at 2°C - 10°C.

Stable until the expiration date.

(2) (B) UTP dsRNA Standard / (C) m1 ψ dsRNA Standard

If unused, store at 2°C - 10°C. Stable until the expiration date.

Note : Do not store standard solutions after dilution.

(3) (D) Sample Reaction Buffer / (E) Antibody Reaction Buffer

When using a portion of the solution, transfer slightly more than the required volume into a separate container.

Immediately cap the remaining solution tightly and store at 2°C - 10°C ; do not allow it to reach room temperature.

Stable until the expiration date.

(4) (F) Biotin-conjugated Antibody

Immediately cap the remaining solution tightly and store at 2°C - 10°C ; do not allow it to reach room temperature. Stable until the expiration date.

Store the reconstituted biotin-conjugated antibody stock solution at 2°C - 10°C and use within 2 weeks.

For longer-term storage, freeze and store at -20°C or below. Do not subject to repeated freeze-thaw cycles.

Note : Discard any remaining diluted solution.

(5) (G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Immediately cap the remaining solution tightly and store at 2°C - 10°C ; do not allow it to reach room temperature. Stable until the expiration date.

When using only part of the solution, remove only the volume required for dilution from the refrigerator. Immediately cap the remaining undiluted stock tightly and store at 2°C - 10°C ; do not allow it to reach room temperature. Stable until the expiration date.

Discard any unused working solution (already diluted). The remaining undiluted solution may be stored tightly closed at 2°C - 10°C.

(6) (H) TMB Solution

When using only a part of the solution, transfer slightly more than the required volume into a separate container.

The remaining undiluted solution may be stored tightly closed at 2°C - 10°C.

Stable until the expiration date.

(7) (I) Stop Solution

When using only a part of the solution, transfer slightly more than the required volume into a separate container.

The remaining undiluted solution may be stored tightly closed at 2°C - 10°C.

Stable until the expiration date.

(8) (J) Wash Solution (10×)

Cap tightly and store at 2°C - 10°C. Stable until the expiration date.

The remaining undiluted buffer may be stored tightly closed at 2°C - 10°C. Dispose any unused diluted buffer.

6. Equipment or supplies required but not supplied ☐ : Use as a check box

- ☐ Deionized water (ultrapure water, RNase-free recommended)
- ☐ RNase-free tubes and/or deepwell plates for standards and antibody dilution
- ☐ Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- ☐ Micropipettes (disposable tip type) (One capable of accurately pipetting 10 μ L, and one capable of accurately pipetting 200 μ L - 500 μ L)
- ☐ Repeater pipette capable of continuously dispensing 100 μ L (recommended)
- ☐ Paper towel to remove washing buffer remaining in wells.
- ☐ A vortex-type mixer
- ☐ A shaker for 96-well plate (approximately 600 rpm to 800 rpm)
- ☐ An automatic washer for 96-well plate (recommended), or a wash bottle with a jet nozzle
- ☐ A 96-well plate reader (450 nm $\pm$ 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm)
- ☐ Software for data analysis

7. Preparation of Samples

Dilute the sample as necessary to ensure that the concentration falls within the assay range. Use the same containers and addition methods for each measurement.

(1) Method for Measuring mRNA Sample Concentration

For mRNA samples after *in vitro transcription* (IVT) reactions, we recommend quantification using RNA-binding fluorescent dyes.

Our company has successfully performed quantification using "RNA Quantification Kit for Purified EV" (Product Code : 297-97901).

For purified samples (after impurity removal), in addition to the above method, quantification by absorbance measurement is also possible.

(2) Concentration Adjustment Method for UTP mRNA Samples and m1 ψ mRNA Samples

We recommend adjusting the concentration of UTP mRNA samples to 100 ng/mL or less, and m1 ψ mRNA samples to 500 ng/mL or less.

8. Preparation of Reagents

Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) for approximately 2 hours before use.

8-1. [(B) UTP dsRNA Standard / (C) m1 ψ dsRNA Standard]

Prepare the standard solutions by mixing each concentration with the (D) Sample Reaction Buffer included in the kit, equilibrated to room temperature. Use the same containers and addition methods for each measurement.

Use (B) UTP dsRNA Standard when measuring UTP samples, and (C) m1 ψ dsRNA Standard when measuring m1 ψ samples. The following is provided as an example.

[(B) UTP dsRNA Standard]

Concentration (pg/mL)	Volume of UTP dsRNA standard solution	(D) Sample Reaction Buffer
1,000,000	1 μ g/mL original solution : 50 μ L	—
100,000	1 μ g/mL original solution : 10 μ L	90 μ L
1,000	100,000 pg/mL solution : 6 μ L	594 μ L
444	1,000 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
198	444 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
87.8	198 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
39.0	87.8 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
17.3	39.0 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
7.71	17.3 pg/mL solution : 200 μ L	250 μ L
0	0 (Blank)	250 μ L

[(C) m1ψ dsRNA Standard]

Concentration (pg/mL)	Volume of m1ψ dsRNA standard solution	(D) Sample Reaction Buffer
1,000,000	1 μg/mL original solution : 50 μL	–
200,000	1 μg/mL original solution : 10 μL	40 μL
2,000	200,000 pg/mL solution : 6 μL	594 μL
889	2,000 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
395	889 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
176	395 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
78.0	176 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
34.7	78.0 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
15.4	34.7 pg/mL solution : 200 μL	250 μL
0	0 (Blank)	250 μL

8.2. [(F) Biotin-conjugated Antibody]

Before beginning the procedure, reconstitute (F) Biotin-conjugated Antibody (lyophilized) in 120 μL of purified water equilibrated to room temperature (RNase-free recommended) and allow to stand for **at least 10 minutes**. Then dilute the required volume **100-fold** with (E) Antibody Reaction Buffer to prepare the biotin-conjugated antibody solution.

The reconstituted stock solution can be stored for up to 2 weeks at 2°C - 10°C. For longer-term storage, keep at -20°C or below.

Do not subject to repeated freeze-thaw cycles. Do not store the diluted solution; discard after use.

8.3. [(G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

During the 1-hour incubation with biotin-conjugated antibody, dilute (G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution **100-fold** with (E) Antibody Reaction Buffer equilibrated to room temperature.

8.4. [(J) Wash Solution (10×)]

Dilute (J) Wash Solution **10-fold** with purified water (RNase-free recommended) equilibrated to room temperature.

* All other reagents are ready for use as supplied.

9. Assay Procedure

- Before beginning each step, prepare all reagents to be dispensed in the following step.
 - Use of a multichannel pipette for continuous dispensing is recommended for the dispensing steps (2), (3), (6), (9), (12), and (15).
- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the wells with 300 μL of Wash Solution (1×) and discard 3 times, then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
If bubbles remain during manual washing using a wash bottle or other method, try allowing the wash solution to overflow only during the final wash cycle to remove bubbles remaining in the wells.
 - (2) Pipette 100 μL each of the standard dilution solutions into the respective wells.
 - (3) Pipette 100 μL of each sample, diluted with (E) Sample Reaction Buffer, into the sample wells.
 - (4) Cover the plate with a plate seal and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 2 hours with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.*
 - (5) Discard the reaction mixture and rinse the wells as described in step (1).
 - (6) Pipette 100 μL of biotin-conjugated antibody solution into each well.
 - (7) Cover the plate with a plate seal and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 1 hour with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.*
 - (8) Discard the reaction mixture and rinse the wells as described in step (1).
 - (9) Pipette 100 μL of diluted (G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution into each well.
 - (10) Cover the plate with a plate seal and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 1 hour with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.*
 - (11) Discard the reaction mixture and rinse the wells as described in step (1).
 - (12) Pipette 100 μL of (H) TMB solution (equilibrated to room temperature) into each well.
 - (13) Shake using a microplate shaker. (Recommended shaking conditions: approximately 600 rpm for 10 seconds, repeated 3 times.)
 - (14) Cover the plate with a plate seal and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 30 minutes under light-protected conditions.*
 - (15) Add 100 μL of (I) Stop Solution (equilibrated to room temperature) to each well, and shake using a microplate shaker. (Recommended shaking conditions: approximately 600 rpm for 10 seconds, repeated 3 times.)

(16) Promptly measure the absorbance of each well at 450 nm and at the reference wavelength of 620 nm (within the range of 600 nm - 650 nm).

[Supplementary notes]

Peel off the protective backing from the plate seal and apply the adhesive side to the plate.

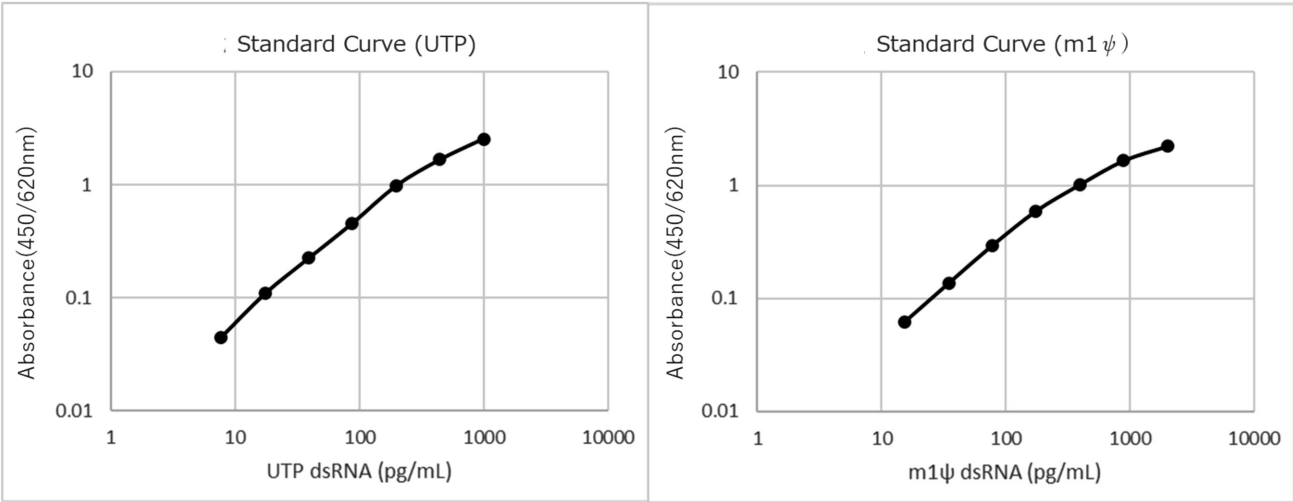
Do not reuse plate seals.

10. Calculation

- (1) Create a calibration curve for each measurement, with the standard concentration (pg/mL) on the X-axis and absorbance on the Y-axis.
- (2) From the calibration curve, read the dsRNA (pg/mL) corresponding to the absorbance of the sample. If a diluted sample is used, the concentration reading is multiplied by the sample dilution ratio to obtain the measurement value.

*In computer software calculations, we recommend using 4 parameters or 5 parameters.

11. Standard Curve (Example)



12. Summary of Assay Procedure ☐ Use as a check box

- *First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.
- ☐ Bring the well-plate and all reagents back to 20°C - 25°C for 2 hours.
- ☐ (J) Wash Solution (10×) : Dilute **10-fold** with purified water (RNase-free recommended) equilibrated to room temperature.
- ☐ (B) UTP dsRNA Standard and (C) m1ψ dsRNA Standard dilution example :
Prepare dilutions using (D) Sample Reaction Buffer supplied with the kit, equilibrated to room temperature.
Use (B) UTP dsRNA Standard when measuring UTP samples, and (C) m1ψ dsRNA Standard when measuring m1ψ samples. The following is provided as an example.

Concentration (pg/mL)	100000	1000	444	198	87.8	39.0	17.3	7.71	0
(B)UTP dsRNA Standard (μL)	Orig.sol. : 10	6*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	—
(D)Sample Reaction Buffer (μL)	90	594	250	250	250	250	250	250	250

Concentration (pg/mL)	200000	2000	889	395	176	78.0	34.7	15.4	0
(C)m1ψ dsRNA Standard (μL)	Orig.sol. : 10	6*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	—
(D)Sample Reaction Buffer (μL)	40	594	250	250	250	250	250	250	250

*One rank higher standard.

- ☐ **Antibody-coated Plate**
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①)
- ☐ **Samples/Standards** **100 μ L**
- ☐ ↓ Incubate at 20°C - 25°C for 2 hours with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.
(F) Biotin-conjugated Antibody :
- ☐ Reconstitute in 120 μ L of purified water, then dilute **100-fold** with (E) Antibody Reaction Buffer equilibrated to room temperature.
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①)
- ☐ **Biotin-conjugated Antibody Solution** **100 μ L**
- ☐ ↓ Incubate at 20°C - 25°C for 1 hour with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.
(G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution :
- ☐ Dilute (G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution **100-fold** with (E) Antibody Reaction Buffer equilibrated to room temperature.
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①)
- ☐ **Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution** **100 μ L**
- ☐ ↓ Incubate at 20°C - 25°C for 1 hour with gentle shaking at approximately 500 rpm using a microplate shaker.
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①)
- ☐ **TMB Solution** **100 μ L**
- ☐ ↓ Shaking (*②). Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing *③)
- ☐ **Stop Solution** **100 μ L**
- ☐ ↓ Shaking (*②)
- ☐ **Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm) immediately.**
(Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)

(*①) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the wells with 300 μ L of washing buffer and discard 3 times, then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells. If bubbles remain during manual washing using a wash bottle or other method, try allowing the wash solution to overflow only during the final wash cycle to remove bubbles remaining in the wells.

(*②) Recommended shaking conditions: approximately 600 rpm for 10 seconds, repeated 3 times.

(*③) Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the Plate Seal used once.

Assay Worksheet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

QCdetect™ dsRNA ELISA Kit
[Storage] Store at 2°C - 10°C (Do not freeze).
[Expiration date] Indicated on the label.
[Package] For 96 tests
[Cat #] 291-99001

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

Group Companies



Distributors



QCdetect™ dsRNA ELISA キット

1. はじめに

mRNA ワクチンをはじめとする mRNA 医薬品の開発において *in vitro* 転写 (IVT) は重要な工程であります。この過程において 2 本鎖 RNA (dsRNA) が副産物として生成されることが知られています。dsRNA は高い免疫原性を示すことが知られていることから、mRNA を主成分とする医薬品、ワクチンの生産プロセスにおいて残存 dsRNA 量を測定し、定量することが必要とされています。

本品は dsRNA の濃度を高感度に測定可能な ELISA キットです。本キットは研究用にのみご使用下さい。

2. 測定原理

測定プレートの各ウェルには抗 dsRNA 抗体 clone : J2 が固相化されています。このウェルに標準溶液またはサンプルを反応させます。次に、ビオチン標識抗 dsRNA 抗体 clone : J2 を入れて反応させます。さらに、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン反応させます。その後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを TMB 溶液と反応させます。反応は反応停止液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物を 450nm (副波長 620nm) で比色測定します。標準品濃度に対して吸光度をプロットした標準曲線を作成し、この標準曲線からサンプル中の dsRNA の濃度を求めることができます。

3. キット性能

検量線範囲	UTP : 7.7pg/mL - 1,000pg/mL m1ψ : 15.4pg/mL - 2,000pg/mL
測定対象	dsRNA
測定対象サンプル	精製 mRNA 溶液
測定時間	約 4.5 時間
検出法	発色系
測定波長	主波長 450nm / 副波長 620nm

4. 使用上の注意

1. キットの試薬は使用前に必ず室温 (20℃ ~ 25℃) に戻して下さい (約 2 時間程度)。
2. 各操作を始める前に、次の操作で使用する試薬を前もって用意して下さい。
3. 本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方でご使用下さい。
4. 用手法で測定する際には、ピペット操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
5. 準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
6. 試薬類を皮膚に付着させないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
7. 本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
8. 使用済みの測定試料、使用した消耗品等は 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。
9. 使用した消耗品や未使用の薬品類は、所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
10. ロット番号の違う試薬と混ぜて使用しないで下さい。
11. 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止するため、必ずプレートシールを貼って下さい。
12. ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温 : 20℃ ~ 25℃ (実験台上またはインキュベータ内温度) を厳守して下さい。風速 (エアコンの風も含む) : 0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。
13. 標準溶液や mRNA サンプルの調製には、同一種類のチューブまたはディープウェルプレートを使用して下さい。材質や表面処理の違いで RNA の吸着量が変わり、測定結果に影響する可能性があります。使用する容器や添加方法は測定間ごとに統一して下さい。

5. キット内容

5-1. キット構成品

構 成 品	状 態	容 量
(A) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) UTP dsRNA Standard UTP dsRNA 標準品	希釈後使用	50 μ L / 本
(C) ml ψ dsRNA Standard ml ψ dsRNA 標準品	希釈後使用	50 μ L / 本
(D) Sample Reaction Buffer サンプル反応用緩衝液	そのまま使用	25mL / 1 本
(E) Antibody Reaction Buffer 抗体反応用緩衝液	そのまま使用	25mL / 1 本
(F) Biotin-conjugated Antibody ビオチン結合抗体	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
(G) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	希釈後使用	120 μ L / 1 本
(H) TMB Solution TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) Stop Solution 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(J) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×)	調製後使用	100mL / 1 本
Plate Seal プレートシール	そのまま使用	4 枚

5-2. 試薬の安定性と保存方法

キットを分割して使用される際、未使用の試薬の安定性と保存方法は、以下を参考にして下さい。

(1) (A) 抗体固相化プレート

プレートは分割使用可能です。

未使用の抗体固相化ストリップはジップシールパックに戻し、2℃～10℃で保存して下さい。

有効期限内安定性を保ちます。

(2) (B) UTP dsRNA 標準品 / (C) ml ψ dsRNA 標準品

未使用の場合、2℃～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

※希釈調製後の各標準溶液は保存しないで下さい。

(3) (D) サンプル反応用緩衝液 / (E) 抗体反応用緩衝液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移して下さい。

残りの未使用の溶液は、室温に戻さず直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

有効期限内安定性を保ちます。

(4) (F) ビオチン結合抗体

未使用の場合、2℃～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

調製後のビオチン結合抗体原液は、2℃～10℃で保存し、2週間以内に使用して下さい。

それ以上保存する場合は、-20℃以下で凍結させて保存して下さい。また、複数回凍結融解しないで下さい。

※使用残りの希釈済み液は破棄して下さい。

(5) (G) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

未使用の場合、2℃～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し必要分を希釈調製し、残りの原液は室温に戻さず直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(6) (H) TMB 溶液

一部の溶液を使用する際は、必要量より少し多めの量を別の容器に移して下さい。

残りは、室温に戻さず直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

有効期限内安定性を保ちます。

(7) (I) 反応停止液

一部の溶液を使用する際は、必要量より少し多めの量を別の容器に移して下さい。

使用残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

有効期限内安定性を保ちます。

(8) (J) 洗浄液 (10×)

蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

6. 器具及び装置 □チェックリスト

- ☐ 精製水 (RNase フリー推奨)
- ☐ 標準溶液 / 検体希釈用チューブやディープウェルプレート (RNase フリー推奨)
- ☐ 洗浄液希釈用器具 (乾熱滅菌済みガラス器具、ストレージボトル等滅菌グレード以上を推奨)
- ☐ チップ交換型ピペット (使い捨てチップで 10 μ L を正確にピペティングできるもの、及び 200 μ L ～ 500 μ L を正確にピペティングできるもの)
- ☐ 連続分注ピペット、100 μ L を連続分注できるもの (あれば好ましい)
- ☐ ペーパータオル等の吸水性のあるもの (洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
- ☐ 攪拌器 (Vortex タイプ)
- ☐ マイクロプレート振とう器 (約 600rpm ～ 800rpm)
- ☐ 96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または洗浄瓶
- ☐ 96 ウェルプレートリーダー (吸光測定用。450 $\pm$ 10nm、620nm : 600nm ～ 650nm)
- ☐ データ処理ソフトウェア

7. サンプルの調製方法

任意のサンプルを、検量線範囲に収まるように希釈調製して下さい。使用する容器や添加方法は測定間ごとに統一して下さい。

(1) mRNA サンプルの濃度測定方法

in vitro 転写反応 (IVT) 後の mRNA サンプルについては、RNA 結合性蛍光色素を用いた定量法を推奨します。

当社では、精製 EV 用 RNA 定量キット (製品コード : 297-97901) で定量の実績があります。

精製後 (不純物除去後) のサンプルについては、上記の方法に加えて、吸光度測定による定量法も可能です。

(2) 核酸修飾別の mRNA サンプルの濃度調整方法

UTP mRNA サンプルは 100ng/mL 以下、m1 ψ mRNA サンプルは 500ng/mL 以下となるように濃度調整を行うことを推奨します。

8. 試薬類の調製方法

キットの試薬は使用前に必ず室温 (20℃～25℃) に戻して下さい (2 時間程度)。

8-1. (B) UTP dsRNA 標準品 / (C) m1 ψ dsRNA 標準品

室温化されたキット添付の (D) サンプル反応用緩衝液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して、標準溶液を調製して下さい。使用する容器や添加方法は測定間ごとに統一して下さい。

UTP の mRNA を測定する際は (B) UTP dsRNA 標準品、m1 ψ の mRNA を測定する場合は (C) m1 ψ dsRNA 標準品を使用して調製して下さい。

下記は一例です。

・ (B) UTP dsRNA 標準品の希釈例

濃度 (pg/mL)	UTP dsRNA 標準溶液の容量	(D) サンプル反応用緩衝液
1,000,000	1 μ g/mL 標準品溶液 : 50 μ L	—
100,000	1 μ g/mL 標準品溶液 : 10 μ L	90 μ L
1,000	100,000pg/mL 溶液 : 6 μ L	594 μ L
444	1,000pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
198	444pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
87.8	198pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
39.0	87.8pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
17.3	39.0pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
7.71	17.3pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
0 (B ₀)	—	250 μ L

・(C) ml ψ dsRNA 標準品の希釈例

濃度 (pg/mL)	ml ψ dsRNA 標準溶液の容量	(D) サンプル反応用緩衝液
1,000,000	1 μ g/mL 標準品溶液 : 50 μ L	—
200,000	1 μ g/mL 標準品溶液 : 10 μ L	40 μ L
2,000	200,000pg/mL 溶液 : 6 μ L	594 μ L
889	2,000pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
395	889pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
176	395pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
78.0	176pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
34.7	78.0pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
15.4	34.7pg/mL 溶液 : 200 μ L	250 μ L
0 (B ₀)	—	250 μ L

8.2. ビオチン結合抗体溶液

操作を始める前に (F) ビオチン結合抗体 (凍結乾燥品) を室温化した 120 μ L の精製水 (RNase フリー推奨) で溶解し、**10 分以上** 静置して下さい。その後、必要量を (E) 抗体反応用緩衝液で **100 倍** に希釈してビオチン結合抗体溶液を調製して下さい。

溶解後の原液は、2℃～10℃で2週間まで保存できます。それ以上の保存は-20℃以下で行って下さい。

また、複数回凍結融解しないで下さい。希釈した溶液は保存せず、廃棄して下さい。

8.3. (G) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

ビオチン結合抗体溶液を1時間反応させている間に、室温化させた (E) 抗体反応用緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。

8.4. (J) 洗浄液 (10×)

精製水 (RNase フリー推奨) で **10 倍** に希釈し使用して下さい。

※その他の試薬はそのまま使用します。

9. 測定操作

- ・各操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。
- ・(2)、(3)、(6)、(9)、(12)、(15) の試薬分注操作は、マルチチャネルピペットでの連続分注を推奨します。
- (1) (A) 抗体固相化プレートと、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし取り除く操作を3回実施します。
その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
(*①)
- (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 100 μ L ずつ分注します。
- (3) サンプル測定ウェルに (E) サンプル反応用緩衝液で希釈調製したサンプルを 100 μ L ずつ分注します。
- (4) プレートシールを貼り、室温 (20℃～25℃) で約 500rpm で2時間攪拌します。(*②)
- (5) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄します。
その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
(*①)
- (6) 各ウェルにビオチン結合抗体溶液を 100 μ L ずつ分注します。
- (7) プレートシールを貼り、室温 (20℃～25℃) で約 500rpm で1時間攪拌します。(*②)
- (8) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄します。
その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
(*①)
- (9) 各ウェルに調製した (G) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 100 μ L ずつ分注します。
- (10) プレートシールを貼り、室温 (20℃～25℃) で約 500rpm で1時間攪拌します。(*②)
- (11) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄します。
その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
(*①)
- (12) 各ウェルに調製した (H) TMB 溶液を 100 μ L ずつ分注します。
- (13) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
- (14) プレートシールを貼り、室温 (20℃～25℃) で30分間静置します。(*②)
- (15) 各ウェルに (I) 反応停止液を 100 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
- (16) 攪拌 (目安は 600rpm、10 秒間、3 回) 後マイクロプレート用分光光度計で 450nm (副波長 620nm) での吸光度を測定します。
副波長は 600nm～650nm の範囲で使用できます。

[操作補足]

(※①) 洗浄方法

3回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。
洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は300 μ L/ウェルです。
洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせ、泡を回避する方法をお試し下さい。

(※②) プレートシールについて

プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。
一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

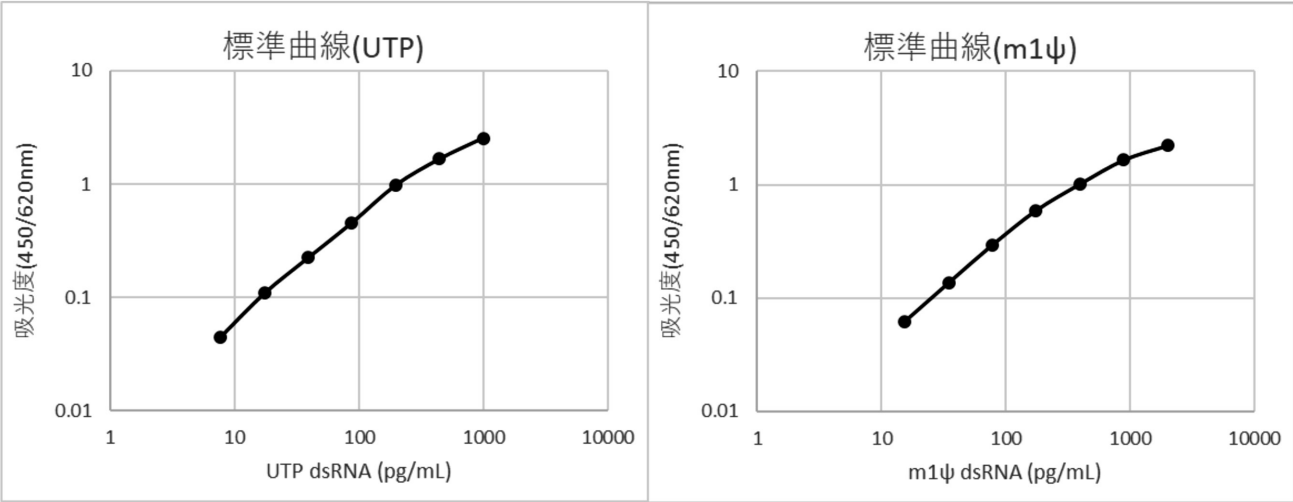
10. 計算方法

- (1) X 軸が標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸が吸光度の検量線を作成します。
- (2) 検量線より、希釈サンプルの吸光度に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。
読み取った濃度に希釈率をかけて測定値とします。

[備考]

・コンピュータソフトでの演算処理では、4 または 5 パラメーターの使用をお薦めします。

11. 標準曲線例



12. 測定手順概要 □チェックリスト

- 必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後、測定操作を行って下さい。
- プレート、試薬類を十分に室温 (20℃～25℃) に戻して下さい (約 2 時間)。
 - (J) 洗浄液 (10×) の調製：室温化された精製水 (RNase フリー推奨) で、**10 倍**に希釈して下さい。
 - 標準溶液の調製 (例)：室温化したキット添付の (D) サンプル反応用緩衝液で調製して下さい。
UTP のサンプルを測定する際は (B) UTP dsRNA 標準品、m1ψ のサンプルを測定する場合は (C) m1ψ dsRNA 標準品を使用して調製して下さい。
下記は一例です。

調製例	濃度(pg/mL)	100000	1000	444	198	87.8	39.0	17.3	7.71	0
	UTP 標準溶液 (μL) 原液：	10	6*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	—
	サンプル反応用緩衝液 (μL)	90	594	250	250	250	250	250	250	250
	濃度(pg/mL)	200000	2000	889	395	176	78.0	34.7	15.4	0
	m1ψ標準溶液 (μL) 原液：	10	6*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	—
	サンプル反応用緩衝液 (μL)	40	594	250	250	250	250	250	250	250

*：ひとつ高濃度の標準溶液

☐	抗体固相化プレート	
☐	↓ 洗浄 3 回 (*①)	
☐	サンプルまたは標準溶液	100 μL
☐	↓ マイクロプレート振とう機で 500rpm で攪拌しながら室温 (20℃ ~ 25℃) で 2 時間反応	
☐	* (F) ビオチン結合抗体からビオチン結合抗体溶液の調製 (精製水 120 μ L で溶解後、室温化した (E) 抗体反应用緩衝液で 100 倍 に希釈して下さい。)	
☐	↓ 洗浄 3 回 (*①)	
☐	ビオチン結合抗体溶液	100 μL
☐	↓ マイクロプレート振とう機で 500rpm で攪拌しながら室温 (20℃ ~ 25℃) で 1 時間反応	
☐	* (G) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の調製 (室温化した (E) 抗体反应用緩衝液で 100 倍 に希釈して下さい。)	
☐	↓ 洗浄 3 回 (*①)	
☐	ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	100 μL
☐	↓ マイクロプレート振とう機で 500rpm で攪拌しながら室温 (20℃ ~ 25℃) で 1 時間反応	
☐	↓ 洗浄 3 回 (*①)	
☐	TMB 溶液	100 μL
☐	↓ 攪拌 (*②)、室温 (20℃ ~ 25℃)、30 分間反応、静置 (*③)	
☐	反応停止液	100 μL
☐	↓ 攪拌 (*②)	
☐	吸光度測定 (主波長 450nm、副波長 620nm : 600 ~ 650nm)	

(*①) 3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μ L/ ウェルです。洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせて泡を回避する方法をお試し下さい。

(*②) 攪拌の目安は 600rpm、10 秒間、3 回。

(*③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【使用期限】

【備考】

【製品名】 QCdetect™ dsRNA ELISA キット

【和光コード】 291-99001

【英語表記】 QCdetect™ dsRNA ELISA Kit

【貯法】 2℃ ~ 10℃ 保存

【使用期限】 ラベルに記載

【包装】 96 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741