

端粒酶活检测试剂盒

（RQ-TRAP 法）

说明书

货号：1802950

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK®端粒酶活检测试剂盒（Real-time Quantitative TRAP 法，即 RQ-TRAP 法）基于端粒重复扩增程序（TRAP）和荧光定量 PCR 技术，设计了双重荧光 qPCR 反应体系：一方面，以内参基因评估待测样品中是否存在 PCR 抑制物，排除假阴性的可能；另一方面，以 TSR8 为定量参考品对待测样品的端粒酶活性进行精确定量。从而实现了高灵敏度、准确定量检测端粒酶活的目的。另外，本试剂盒为闭盖检测，省去了凝胶电泳或 ELISA 分析等的繁琐操作，极大地提高了检测效率，同时也降低了待测样品被污染的风险。

参照《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》所述相关内容，本试剂盒可以监测干细胞活性及生长状况，也可在一定程度用于体外表征细胞的成瘤性。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	Cell Lysis Buffer	NND058	1.5 mL × 5 管	-18 °C及以下
	RNase inhibitor	NND060	50 μL × 1 管	-18 °C及以下
	Telomerase positive cells Pellet	NNA060	10 ⁵ Cells × 2 管	-18 °C及以下
II	2×TRAP qPCR Reaction Buffer	NNB022	650 μL × 4 管	-18 °C及以下
	TRAP qPCR Reaction Enzyme	NNC108	100 μL × 2 管	-18 °C及以下
	TRAP Primer&Control MIX	NNC109	300 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
	TSR8	NNA059	50 μL × 1 管	-18 °C及以下
	TRAP qPCR Reaction Replenisher	NND059	650 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光

■ 规格

200 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 18 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- Roche LightCycler 480 II

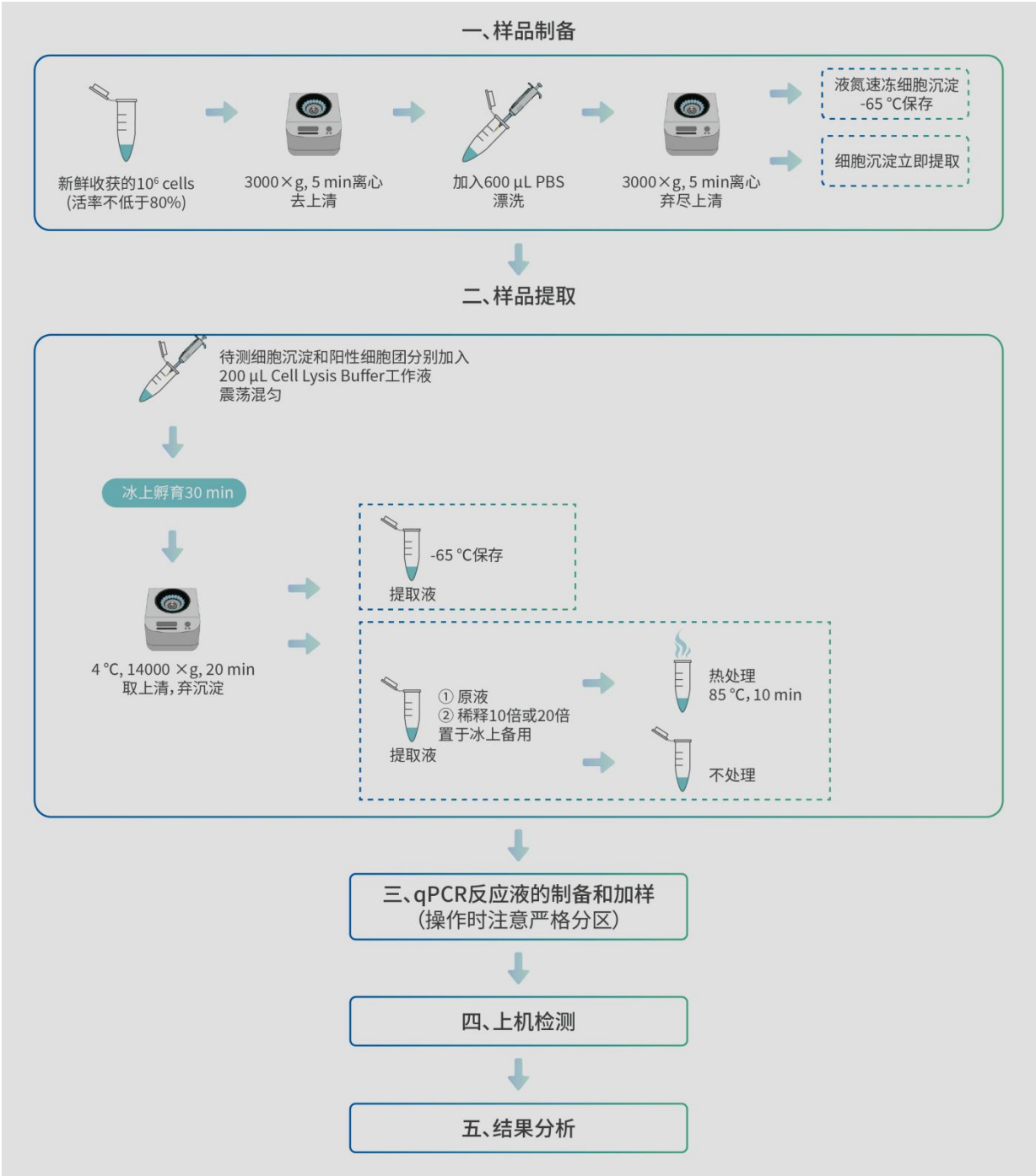
■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌无核酸酶低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL 无核酸酶低吸附带滤芯枪头
- PBS (无 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , pH=7.4 左右)

■ 相关设备

- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪
- 台式高速冷冻离心机
- 金属浴或水浴锅

■ 实验操作流程



注：实验过程中应注意严格的分区，样品制备区、阳性区、阴性区可在单独一个房间进行划分，扩增间应另外配备 1 个房间，各区域间应避免交叉污染。

■ 实验操作

一、样品准备

（一）制备 Cell Lysis Buffer 工作液（阴性区）

1. 计算实验所用 Cell Lysis Buffer 工作液的用量

总量= 400 μL (标曲配制) + 200 μL $\times$ 样品数量 (样品提取) + 50 μL $\times$ 样品数量 (样品稀释)

2. Cell Lysis Buffer 工作液配制

在阴性区域按照每 1 mL Cell Lysis Buffer+5 μL RNase inhibitor 的配比配制 Cell Lysis Buffer 工作液, 置于冰上预冷备用。

- 注意 Cell Lysis Buffer 工作液要现配现用。
- 注意 Cell Lysis Buffer 工作液要在阴性区进行配制, 配制完成后置于冰上预冷。

(二) 样品准备 (样品制备区)

1. 取新鲜收获的 10^6 个 cells (要求活率不低于 80%), $3000\times g$ 离心 5 min, 移液枪小心去上清, 接着加入 600 μL 左右的 PBS 漂洗细胞。
2. $3000\times g$ 离心 5 min, 移液枪小心去尽上清, 保留细胞沉淀。

根据实际情况可进行以下操作:

- ① 情况 1: 不能立即进行样品提取, 可将细胞沉淀用液氮速冻 30 s 后置于 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下保存, 保存时间建议不超过 1 年, 不可反复冻融;
 - ② 情况 2: 立即进行样品提取, 将细胞沉淀置于冰上备用。
- 注意此步骤离心后应尽可能去尽上清液, 仅保留细胞沉淀。
 - 注意以上步骤操作均应在样品制备区进行。

二、样品提取 (样品制备区)

(一) 样品提取

1. Telomerase positive cells Pellet $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $14000\times g$ 离心 1 min, 将细胞冻干粉收集至管底。
2. 在待测细胞沉淀和 Telomerase positive cells Pellet 中分别加入 200 μL Cell Lysis Buffer 工作液, 漩涡振荡器上轻微涡旋混匀, 快速离心 3 s, 将液体收集至管底。
 - 加入 Cell Lysis Buffer 工作液后细胞应呈均匀分布状态, 若有肉眼可见的细胞团存在, 则需进行震荡混匀至细胞分布均匀。
3. 冰上 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右) 孵育 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $14000\times g$ 离心 20 min, 取 160 μL 左右的上清液作为**样品提取液**, 置于冰上备用。

- 注意剩余提取液需尽快置于-65 °C冰箱保存, 建议保存时间不超过 6 个月。
- 样品提取液应避免反复冻融, 建议将剩余提取液小体积分装保存。

(二) 样品提取液的处理

1. 稀释 (如需)

取 5 μ L 样品提取液+45 μ L Cell Lysis Buffer 工作液进行 10 倍的稀释, 置于冰上备用。

- 因样品中可能存在 PCR 抑制物, 故对待测样品提取液是否要稀释作出以下说明:

- ① 对于端粒酶活性高的样品 (如: 肿瘤细胞、自发永生化细胞、hiPSC 细胞等), 首次测试建议稀释 10 倍后再进行检测, 或直接对 10^5 cells 进行提取检测;
- ② 对于端粒酶活性低的样品 (如: 原代细胞、有限细胞系、hMSC 细胞等), 首次测试建议提取液直接检测;
- ③ 对于端粒酶活性未知的样品, 首次测试建议提取液进行至少两个浓度的测试: 提取原液和稀释 10 倍后的提取液。

以上建议仅供参考, 提取液最佳稀释倍数以用户实际经验为主。

- 样品提取液应始终置于冰上, 以保持端粒酶活性。
- Telomerase positive cells Pellet 的提取液不需要稀释直接检测即可。

2. 热处理

取 10 μ L 待测样品提取原液或稀释后的提取液置于新的 1.5 mL EP 管中, 在 85 °C 的金属浴或水浴中热处理 10 min, 缓慢冷却至室温后, 快速离心 3 s 将液体收集到管底备用。

- 目的是通过热处理使得待测样品中的端粒酶失活, 以此作为阴性质控确保检测结果的准确性。
- 每个待测样品的提取液都需要进行热处理。

三、qPCR 反应液的制备和加样

(一) 制备 qPCR 反应液 (阴性区)

1. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化, 充分混匀后根据下表所示配制 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应	30 孔反应 (含 10%的损耗)
2×TRAP qPCR Reaction Buffer	12.5 μL	412.5 μL
TRAP qPCR Reaction Enzyme	1 μL	33 μL
TRAP Primer&Control MIX	3 μL	99 μL
TRAP qPCR Reaction Replenisher	6.5 μL	214.5 μL
总体积	23 μL	759 μL

2. 将 qPCR MIX 充分混匀后按照 23 μL /管分装至 8 联管或 96 孔板中, 置于冰上备用。

(二) 制备 TSR8 定量参考品标准曲线 (阳性区)

1. 取一支干净的 1.5 mL 离心管, 按照 TSR8 的标签标识用 Cell Lysis Buffer 工作液将 TSR8 定量参考品稀释至 200 amol/ μL , 标记为 ST0。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
3. 用 Cell Lysis Buffer 工作液, 将标记为 ST0 的定量参考品溶液进行 10 倍梯度稀释, 具体按下表进行稀释操作:

表 3. TSR8 定量参考品的梯度稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (amol/ μL)	TPG Units
ST0	按照标识用 Cell Lysis Buffer 工作液稀释	200	400000
ST1	5 μL ST0 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	20	40000
ST2	5 μL ST1 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	2	4000
ST3	5 μL ST2 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	0.2	400
ST4	5 μL ST3 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	0.02	40
ST5	5 μL ST4 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	0.002	4
ST6	5 μL ST5 + 45 μL Cell Lysis Buffer 工作液	0.0002	0.4

- 配制好的标曲可保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$, 仅供当天使用, 使用前需将标曲充分混匀。
- 为保证稀释过程的准确性, 建议 TSR8 定量参考品稀释时最小取样量不少于 5 μL 。

- 因标品为 ssDNA, 故应避免标品过度震荡，震荡过程要轻柔。
- 标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。
- 1 amol TSR8=1000 TPG Units

(三) 加样

1. 准备好装有 23 μL/管的 qPCR MIX 的 8 联管或 96 孔板、样品提取液以及 TSR8 定量参考品的稀释管 ST1-ST6 等，按下表所示分区域进行加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	23 μL qPCR MIX + 2 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6	阳性区
无模板对照	23 μL qPCR MIX + 2 μL Cell Lysis Buffer 工作液	阴性区
阴性质控	23 μL qPCR MIX + 2 μL 热处理样品提取液	样品制备区
待测样品	23 μL qPCR MIX + 2 μL 样品提取液	
阳性质控	23 μL qPCR MIX + 2 μL Telomerase positive cells 提取液	

- 加样完成后每孔总体积为 25 μL。
- 加样时注意按照上表进行严格分区，建议加样区域依次为：阴性区、样品制备区、阳性区。
- 样品提取液以及 ST1-ST6 使用前建议再次进行混匀操作。
- 因模板体积较小以及 Cell Lysis Buffer 工作液略粘稠，故应在加样时注意对枪头的润洗，以确保模板被全部加入。

表 5. 96 孔板排版示例

NTC	NTC	NTC	PC	PC	PC				ST6	ST6	ST6	A
热灭-S1	热灭-S1	热灭-S1	S1	S1	S1				ST5	ST5	ST5	B
热灭-S2	热灭-S2	热灭-S2	S2	S2	S2				ST4	ST4	ST4	C
热灭-S3	热灭-S3	热灭-S3	S3	S3	S3				ST3	ST3	ST3	D
热灭-S4	热灭-S4	热灭-S4	S4	S4	S4				ST2	ST2	ST2	E
热灭-S5	热灭-S5	热灭-S5	S5	S5	S5				ST1	ST1	ST1	F
热灭-S6	热灭-S6	热灭-S6	S6	S6	S6							G
热灭-S7	热灭-S7	热灭-S7	S7	S7	S7							H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的靶标基因的标准曲线 (ST1-ST6); 无模板对照 NTC; 阴性质控: 热灭 S1-S7; 待测样品: S1-S7 ; 阳性质控: PC。建议每个检测做 3 个重复孔。
- 实际检测时可根据样品多少, 参照表 5 示例进行排版加样。

四、上机检测

将 96 孔板用光学膜封闭或 8 联管盖上相应的盖子轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪, 接着进行 qPCR 程序设置:

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。创建两组检测探针, 分别为靶标基因命名为 Target, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none(如有); 创建内参基因命名为 IC, 选择报告荧光基团为 CY5, 猝灭荧光基团为 none(如有); 检测参比荧光为 ROX(如需)。
2. 设置三步法反应程序:
 - 30 °C 30 分钟;**
 - 95 °C 2 分钟;**
 - 95 °C 15 秒, 50 °C 1 分钟, 68 °C 30 秒(读取荧光), 35 个循环;**
 - 反应体积为 25 μ L。

- 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

- ① 在“孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。

靶标基因 FAM 通道标准曲线孔的样品类型一栏设置为标准品, 根据表在属性一栏分别赋值, 设为 40000、4000、400、40、4、0.4(含义为每孔的端粒酶活性, 单位为 TPG Units), 并且在相应的样品名称一栏中命名。将无模板对照 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照, 将阴性质控孔和待测样品孔的样品类型设置为待测样品, 并且在相应的样品名称一栏中命名。

- ② 选择步骤 2: 选择项目中的“端粒酶活检测”程序。
- ③ “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。
- ④ 在实验分析的标准曲线面板中, 可读取各标准曲线的斜率、截距、相关系数和扩增效率。
- ⑤ 在实验分析的反应孔信息表面板中, 浓度和平均浓度一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控、待测样品的检测值, 单位为 TPG Units。

- 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。
 - ① 在 Results 的 Amplification Plot 中, 将 Threshold 设置为 0.1, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
 - ② 在 Results 的 Plate 中, 将靶标基因 FAM 通道标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别进行赋值, 设为 40000、4000、400、40、4、0.4 (含义为每孔的端粒酶活性, 单位为 TPG Units), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名。
 - ③ 在 Results 的 Plate 中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控孔和待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名之后点击 。
 - ④ 在 Results 的 Standard Curve 中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。
 - ⑤ 在 Results 的 Report 中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控孔和待测样品孔的检测值, 单位为 TPG Units。
-  上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

五、结果分析

1. 阳性质控 (Telomerase positive cells):
 - 内参基因 (CY5): Ct 值与标曲及 NTC 的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环;
 - 靶标基因 (FAM): 有检出。满足以上条件, 则视为阳性质控正常。
2. 无模板对照 (NTC) 和阴性质控 (热处理样品):
 - 内参基因 (CY5): Ct 值与标曲及 NTC 的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环;
 - 靶标基因 (FAM): Ct 值 > 检测限。满足以上条件, 则视为阴性对照正常; 若出现靶标基因 (FAM) 的 Ct 值 $\leq$ 检测限, 一般表明检测体系存在污染, 需要进行原因排查。
3. 标曲的参数: 扩增效率应在 83.3% - 110% 范围内, $R^2 \geq 0.990$ 。
4. 待测样品 (在阳性质控、无模板对照及阴性质控均符合实验要求的前提下):
 - 内参基因 (CY5): Ct 值与标曲及 NTC 的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环, 则视为待测样品对反应体系不存在抑制; 若 Ct 值超出 1 个循环, 则认为该

提取液可能对反应体系存在抑制效应, 需将样品进行稀释后重新检测。

- 靶标基因 (FAM):

- ① 待测样品每反应的细胞数量的计算:

细胞数量/reaction=细胞总数/200 μ L (细胞裂解液)/稀释倍数 (如有) $\times$ 2 μ L (模板体积)

例如: 10^6 个 HEK293 cells 加 200 μ L 细胞裂解液后, 稀释 10 倍, 那么此时待测样品每反应的细胞数量为 1000 cells, 即 1000 cells/reaction。

- ② 通过分析软件获得待测样品各检测孔靶标基因 (FAM) 的检测值 (TPG Units), 即可得到待测样品的每反应的细胞数量对应的端粒酶活性。

例如: 1000 cells/reaction 的 HEK293 cells 靶标基因 (FAM) 的检测值为 300 TPG Units, 那么也就是每 1000 个 HEK293 细胞对应的端粒酶活是 300 TPG Units。

生效日期: 2024 年 01 月 31 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 400-878-2189