逆转录酶活性检测试剂盒

（RT-PCR 荧光探针法）

说明书

货号：1505700

版本：A/5

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

逆转录酶活性检测试剂盒，符合《中国药典》2020 版逆转录酶活性检查法，利用 MS2 RNA 为模板，经反转录后再采用荧光探针 qPCR 技术检测特异性扩增信号。

试剂盒适用于生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定过程；但鸡胚成纤维细胞（CEF）或其他禽源性细胞、小鼠及其他啮齿类动物来源的细胞系常含有逆转录病毒基因序列，其逆转录酶活性检测常为阳性。对此，建议按照法规要求采用其他方法进行相应检测。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
M-MLVRT 定量参考品	NNA024	6 μL × 1 管	-18 ℃及以下
反转录 Buffer	NNB010	1 mL × 1 管	-18 ℃及以下，避光
MS2 Primer & Probe MIX	NNC036	150 μL × 1 管	-18 ℃及以下，避光
2×qPCR SHENmix	NNC045	1 mL × 1 管	-18 ℃及以下，避光
100×ROX	NND007	20 μL × 1 管	-18 ℃及以下，避光
ddH_2O	NND010	1 mL × 1 管	-18 ℃及以下
MS2 RNA	NND011	15 μL × 1 管	-18 ℃及以下
A 液	NND012	1.5 mL × 2 管	-18 ℃及以下
B 液	NND013	750 μL × 1 管	-18 ℃及以下

- 100×ROX 解冻后于 2-8 ℃、避光保存。

■ 规格

50 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 12 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
- CFX96 定量 PCR 系统
- LineGene 9600 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 10 mg/mL RNase A，用户自备

➢阳性对照品，联系本公司订购（逆转录酶活性检测阳性对照 PC，货号：1505701）

➢1.5 mL RNase Free 低吸附离心管

➢qPCR 反应板或八联管

➢1000 μL，100 μL，10 μL RNase Free 低吸附带滤芯枪头

■ **相关设备**

➢荧光定量 PCR 仪

➢1000 μL，100 μL，10 μL 移液枪

■ **操作过程**

❖ **M-MLVRT 定量参考品稀释、标曲样品和灵敏度供试品准备**

M-MLVRT 定量参考品浓度（200 U/μL）标注于管壁标签上， 请确认浓度后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 A 液将 M-MLVRT 定量参考品进行 10 倍梯度稀释，具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 M-MLVRT 定量参考品和 A 液置于冰上或 2-8 ℃条件下融化。待完全融化后，轻弹数下混匀，短时间快速离心 3-5 s，如此重复 3 次。

2. 取 9 支无菌的 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6，ST7，ST8。

3. 在 ST0 管中加入 398 μL A 液，其余各管分别加入 45 μL A 液。

4. 直接吸取 2 μL 的 M-MLVRT 定量参考品，加入 ST0 管中液面以下，反复吹吸 10 次后弃去枪头，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，重复振荡离心 2 次以确保充分混匀，混匀的 ST0 管可于-18 ℃以下稳定保存 1 个月。

5. 按表 2 依次进行稀释，吸头直接吸液后，加入液面下反复吹吸 10 次后弃去枪头，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，重复振荡离心 2 次以确保充分混匀。

表 2. M-MLVRT 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度（pU/μL）
ST0	2 μL M-MLVRT（200 U/μL）+ 398 μL A 液	10^{12}
ST1	5 μL ST0 + 45 μL A 液	10^{11}
ST2	5 μL ST1 + 45 μL A 液	10^{10}
ST3	5 μL ST2 + 45 μL A 液	10^{9}
ST4	5 μL ST3 + 45 μL A 液	10^{8}
ST5	5 μL ST4 + 45 μL A 液	10^{7}
ST6	5 μL ST5 + 45 μL A 液	10^{6}
ST7	5 μL ST6 + 45 μL A 液	10^{5}
ST8	5 μL ST7 + 45 μL A 液	10^{4}

6. 标准曲线为 ST3，ST4，ST5，ST6，ST7，ST8。可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。

7. 用户首次使用本产品应进行检测系统灵敏度测试，灵敏度供试品为 ST8，反转录重复 10 管，qPCR 每管各检测 1 孔，共 10 孔。

❖ 供试品的准备

取供试品 200 μL，5000 转/min，离心 5 min，取上清液 20 μL，加入 B 液 20 μL，混匀后，置冰浴 15 min，此为已处理供试品，置-65 ℃保存备用。

反转录供试品准备：取已处理供试品 5 μL，加入 45 μL A 液中，反复吹吸 10 次混匀，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，重复振荡离心 2 次以确保充分混匀。检测时根据需要，可依次连续稀释至合适的浓度。

❖ 阳性对照品、阴性对照品的准备

1. 阳性对照品：联系本公司订购。依照供试品的准备步骤处理，按单次用量分装，置-65 ℃保存备用。

2. 阴性对照品：A 液。依照供试品的准备步骤处理。

❖ 反转录反应液（RT-MIX）的准备和反转录

1. 根据待检测样品的数量（N），计算所需反应管数。

RT 反应管数= 6 个浓度梯度的标准曲线+N 个供试品+1 个阴性对照品+1 个阳性对照品（首次使用时应额外增加 10 管灵敏度供试品）

2. 根据反应管数计算所需反转录反应液的总量（**含有 2 孔的损失量**）：

RT-MIX =（RT 反应孔数+2）× 20 μL

3. 各试剂放在冰上或 2-8 ℃条件下融化，轻微振荡混匀，根据表 3 所示准备 RT-MIX：

表 3. RT-MIX 配制表

组分	单孔反应
反转录 Buffer	19.7 μL
MS2 RNA	0.3 μL
总体积	20 μL

4. 将 RT-MIX 置于 70 ℃ 孵育 10 min 后，立即置于冰上至少 5 min 后，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，重复振荡离心 2 次以确保充分混匀，然后 20 μL/管分装于 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管或 PCR 联管或 96 孔板中。

5. 按表 4 所示加样，移取相应样品，加入 RT-MIX 中，反复吹吸 10 次后弃去枪头，盖紧管盖或密封，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s。加样完成后每管总体积为 25 μL。

表 4. 各反应管加样示例

标准曲线样品	20 μL RT-MIX + 5 μL ST3/ST4/ST5/ST6/ST7/ST8
灵敏度供试品	20 μL RT-MIX + 5 μL ST8（重复 10 管，首次应做）
供试品	20 μL RT-MIX + 5 μL 反转录供试品
阳性对照品	20 μL RT-MIX + 5 μL 阳性对照品
阴性对照品	20 μL RT-MIX + 5 μL 阴性对照品

6. 反应管置于 37 ℃，4 h 后，得到反转录产物，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，可立即进行 qPCR 反应检测，或-20 ℃保存过夜，次日检测。

❖ qPCR 反应液的制备和加样

1. 根据 RT 反应管数，计算所需 qPCR 反应孔数，一般每个 RT 反应管做 3 个重复孔：

qPCR 反应孔数=RT 反应管数 × 3

2. 根据反应孔数计算所需 qPCR MIX 的总量（**含 2 孔的损失量**）：

qPCR MIX=（qPCR 反应孔数+2）× 25 μL

3. 各试剂放在冰上或 2-8 ℃条件下融化，轻微振荡混匀，根据表 5 所示准备 RT-qPCR MIX：

表 5. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
2×qPCR SHENmix	15 μL
MS2 Primer & Probe MIX	3 μL
RNase A（10 mg/mL，用户自备）	1 μL
100×ROX	0-0.3 μL
ddH_2O	补足总体积 25 μL

注意：

- qPCR MIX 中含有 RNase A，其配制与加样应与反转录操作区域有效隔离。
- ROX 的用量应根据 qPCR 仪器厂家型号由用户自行确定，如 7500 Real-Time PCR System 型用量 0.1 μL，CFX96 Real-Time PCR System 型用量 0 μL。

4. 可参照表 6 所示将 qPCR MIX 25 μL/孔分装于 96 孔板中，移取 5 μL 反转录产物加入相应孔中。加样完成后每孔总体积为 30 μL。

表 6. 96 孔板排版示例

PC				S1	S1	S1			ST3	ST3	ST3	A
PC				S2	S2	S2			ST4	ST4	ST4	B
									ST5	ST5	ST5	C
									ST6	ST6	ST6	D
								ST8-RT7	ST7	ST7	ST7	E
								ST8-RT8	ST8	ST8	ST8	F
NC								ST8-RT9	ST8-RT1	ST8-RT2	ST8-RT3	G
NC								ST8-RT10	ST8-RT4	ST8-RT5	ST8-RT6	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的逆转录酶标准曲线（ST3-ST8）、10 个灵敏度 ST8（来自 10 个反转录反应 RT1、RT2、RT3.....RT10）、1 个阳性对照 PC、1 个阴性对照 NC、2 个待测样品（S1 和 S2）。 除灵敏度外其余每个检测做 3 个 qPCR 重复孔。
- 实际检测时可根据样品多少，参照此示例样进行 96 孔板排版加样。

5. 将 96 孔板用光学膜封闭，快速离心 20 s 后放入 qPCR 仪。

❖ **qPCR 程序设置**

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

1. 点击“实验向导”。

2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1：选择反应孔。

3. 选择步骤 2：选择项目中的“**逆转录酶活性检测**”程序。

4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

✧ 其他定量 PCR 系统程序设置如下：

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

2. 创建新检测探针，命名为 RT，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none；检测参比荧光为 ROX（可选）。

3. 设置反应程序：**37 ℃ 7 min；95 ℃预变性 5 min；95 ℃ 20 s， 57 ℃ 1 min（读取荧光），72 ℃ 10 s，50 个循环；最后 72 ℃延伸 2 min**；反应体积 30 μL。

❖ **qPCR 结果分析**

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

1．“孔板编辑”页面中步骤 3：定义反应孔，将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品，并在标品赋值中分别根据表 2 赋值，设为 10^9、10^8、10^7、10^6、10^5、10^4（单位为 pU /μL），并且在相应的“样本名称”中命名为 ST3、ST4、ST5、ST6 、ST7、ST8。

2．待测样品将样品类型设置为待测样品，NTC 将样品类型设置为无模板对照。

3．在“实验分析”页面点击 ，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4．在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02，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 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值，设为 10^9、10^8、10^7、10^6、10^5、10^4（单位为 pU /μL），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST3、ST4、ST5、ST6、ST7、ST8。

3. 在 Results 的 Plate 面板中，将灵敏度检测孔、阳性对照 PC 孔、阴性对照 NC 孔、供试品孔、加标质控样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名，之后进行数据分析。

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、R^2。

5. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取各检测值，单位为 pU/μL。结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本， 一般也可由仪器自动判读。

❖ 结果判定

1. 实验方法灵敏度认可标准

10 个 10^4 pU/μL（ST8）供试品应全部检出，实验灵敏度合格。

2. 试验有效性

标准曲线 R^2 不低于 0.96，阳性对照 Ct≤28；灵敏度供试品 Ct≤38，视为试验有效。

3. 待测样品结果判定

（1）如果待测样品无 Ct 值结果，或 Ct 值≥40，且无明显的扩增曲线，则判定待测样品中逆转录酶活性为阴性。

（2）如果待测样品 Ct 值<40，且有明显的扩增曲线，则按照下式计算样品中逆转录酶活性单位：

待测样品中逆转录酶活性单位（pU/mL）=A × D × 1000

式中 A 为测定平均值，pU/μL；D 为样品稀释倍数，D=20。

（3）如果待测样品 Ct 值位于 38-40 之间，建议重复测定 1 次，如重复测定 Ct 值<40，且有明显的扩增曲线，则判定为阳性。

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。

■ 相关产品

名称	货号	规格
逆转录酶活性检测阳性对照品	1505701	25 μL × 1 管

修订日期：2023 年 04 月 24 日

生效日期：2023 年 04 月 28 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：0572-2165910