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 ℃及以下
	RNase inhibitor	NND060	50 μL × 1 管	-18 ℃及以下
	Telomerase positive cells Pellet	NNA060	10^5 Cells × 2 管	-18 ℃及以下
II	2×TRAP qPCR Reaction Buffer	NNB022	650 μL × 4 管	-18 ℃及以下
	TRAP qPCR Reaction Enzyme	NNC108	100 μL × 2 管	-18 ℃及以下
	TRAP Primer&Control MIX	NNC109	300 μL × 2 管	-18 ℃及以下，避光
	TSR8	NNA059	50 μL × 1 管	-18 ℃及以下
	TRAP qPCR Reaction Replenisher	NND059	650 μL × 2 管	-18 ℃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

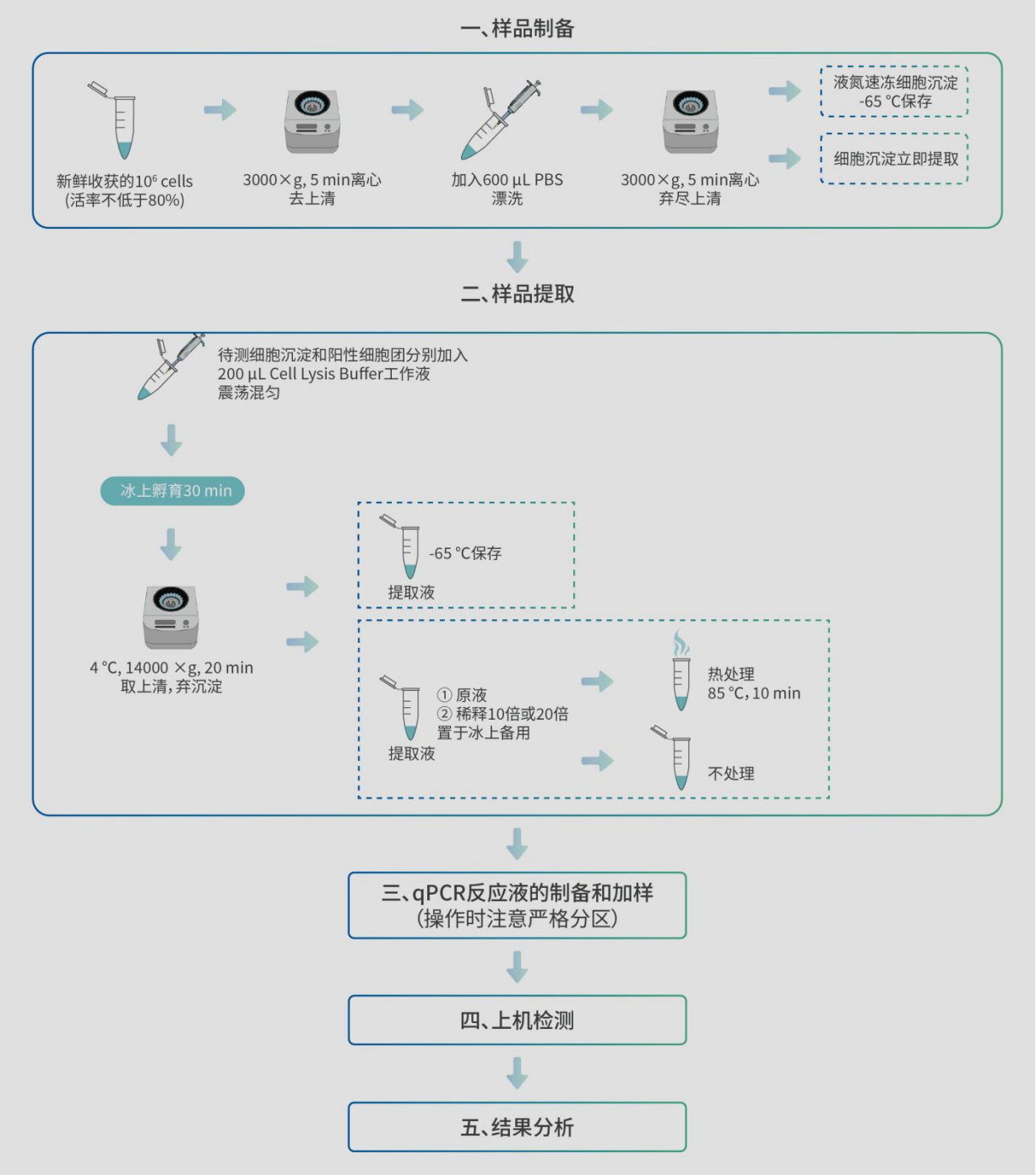
■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 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×样品数量（样品提取）+50 μL×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×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×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 ℃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 ℃条件下 14000×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 ℃左右）孵育 30 min, 4 ℃条件下 14000×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 ℃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 μL 样品提取液+45 μL 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 μL 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 ℃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 ℃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 ℃，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 ℃ 30 分钟；

   95 ℃ 2 分钟；

   95 ℃ 15 秒，50 ℃ 1 分钟，68 ℃ 30 秒（读取荧光），35 个循环；

   反应体积为 25 μL。

- 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≤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 μL（细胞裂解液）/稀释倍数（如有）×2 μL（模板体积）

例如：10^6 个 HEK293 cells 加 200 μL 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 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