

端粒酶活检测试剂盒 (RQ-TRAP 法) 说明书

研发测试装

版本：测试版

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）基于端粒重复扩增方法（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，也可在一定程度上用于体外表征细胞的成瘤性。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	装量	储存条件
Cell Lysis Buffer	1.5 mL×5 管	-18 °C及以下
2×TRAP qPCR Reaction Buffer	650 μL×2 管	-18 °C及以下
TRAP qPCR Reaction Enzyme	100 μL×1 管	-18 °C及以下
TRAP Primer&Control MIX	300 μL×1 管	-18 °C及以下，避光
TSR8	60 μL×1 管	-18 °C及以下
TRAP qPCR Reaction Replenisher	650 μL×1 管	-18 °C及以下，避光
RNase inhibitor	35μL×1 管	-18 °C及以下
Telomerase positive cells Pellet	10 ⁵ cells×2 管	-18 °C及以下

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 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 480II

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

➤1.5 mL 无菌低吸附离心管

➤96 孔 qPCR 板或八联管

➤1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL RNase Free 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

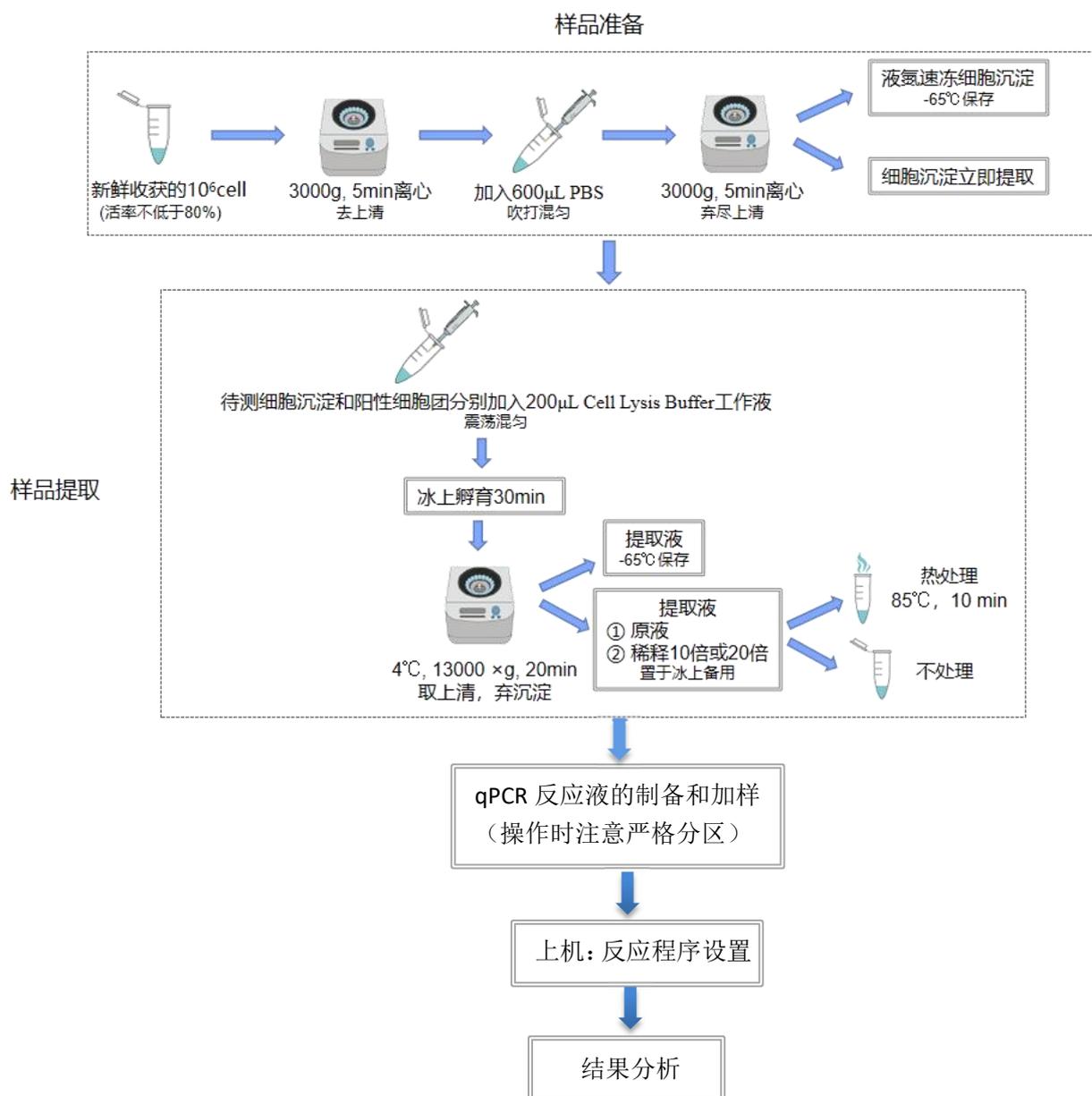
➤荧光定量 PCR 仪

➤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



- 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。

(一) 样品准备

1. 制备 Cell Lysis Buffer 工作液 (阴性区)

1.1 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 或 100 μL × 样品数量 (样品稀释)

1.2 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。

2. 样品准备（样品制备区）

2.1 取新鲜收获的 10^6 个 cells（要求活率不低于 80%），3000g 离心 5min，移液枪小心去上清，接着加入 600 μ L 左右的 PBS 漂洗细胞。

- 加入 PBS 溶液后细胞应呈均匀分布状态，若有肉眼可见的细胞团存在，可用移液枪轻轻吹吸混匀或轻微震荡混匀。

2.2 3000g 离心 5min，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：若不能立即进行样品提取，可将细胞沉淀用液氮速冻 30s 后置于 -65°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。
- 注意此步离心后应尽可能去尽上清液，仅保留细胞沉淀。
 - 注意若为情况 2，则需立即进行后续样品提取。
 - 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）

1. 样品提取

1.1 Telomerase positive cells Pellet 4°C 条件下 $14000\times g$ 离心 1min，将细胞冻干粉收集至管底。

1.2 在待测细胞沉淀和 Telomerase positive cells Pellet 中分别加入 200 μ L Cell Lysis Buffer 工作液，漩涡振荡器上轻微涡旋混匀，快速离心 3s，将液体收集至管底。

1.2 冰上孵育 30 min， 4°C 条件下 $14000\times g$ 离心 20min，取 160 μ L 左右的上清液作为**样品提取液**，置于冰上备用。

2. 样品提取液处理

2.1 计算所需提取液的总量

总量=样品数量 \times 3（3 复孔） \times 2（两个梯度） \times 2 μ L（模板体积）+10 μ L（热处理）+2 μ L（损失量）

- 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 1 年。
- 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。

2.2 样品提取液的处理

● 稀释

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。

➤ 因样品中可能存在抑制 PCR 扩增的物质，故对待测样品提取液是否需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、自发永生化细胞等），首次测试建议稀释 10 倍后再进行检测；

②对于端粒酶活性低的样品（如：原代细胞、有限细胞系等），首次测试建议提取液可不进行稀释直接检测；

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。

以上建议仅供才能考，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。

● 热处理

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

➤ 通过热处理使得待测样品中的端粒酶失活，以此作为阴性对照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，以此作为阴性质控。

➤ 以上所有操作步骤均应在样品制备区进行。

（三）qPCR 反应液的制备和加样

1.制备 qPCR 的反应液（阴性区）

1.1 根据待测样品数量计算所需反应孔数

反应孔数=（6 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+待测样品提取液数量×2 +阳性质控×2）×3 复孔

➤ 标准曲线的浓度点至少为 5 个。

➤ 待测样品提取液数量：若为单一浓度则为待测样品数量；若设置浓度梯度则等于待测样品数量×浓度点个数。

➤ 阳性质控的模板为 Telomerase positive cells 提取液。

1.2 各试剂放在冰上或 2-8°C 条件下融化，充分混匀后在阴性区根据下表所示加样：

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
2×TRAP qPCR Reaction Buffer	12.5 μL
TRAP qPCR Reaction Enzyme	1 μL
TRAP Primer&Control MIX	3 μL
TRAP qPCR Reaction Replenisher	6.5μL
总体积	23μL

1.3 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量

$$\text{qPCR MIX 总量} = (\text{反应孔数} + x) \times 23 \mu\text{L} \quad (x = \text{反应孔数}/10 \text{ 的损失量})$$

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

- 以上实验操作应在阴性区进行。
- 各组分试剂使用前应先进行充分混匀。

2. TSR8 定量参考品标准曲线的制备 (阳性区)

2.1 在阳性区，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。

例如：TSR8 的标签标识为 2148 amol/μL，取一支干净的 1.5 mL 离心管先加如 90.7μL 的 Cell Lysis Buffer 工作液，再加入 9.31μL 的 TSR8，充分混匀，标记为 ST0。

2.2 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6。

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

- 配制好的标曲可保存于 2-8 °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 μ L。
- 因标品为 ssDNA，故应避免标品过度震荡，震荡过程要轻柔。
- 以上实验操作应在阳性区进行。

3. 反应孔加样

3.1 准备好装有 23 μ L/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，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 μ L qPCR MIX + 2 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6	阳性区
无模板对照	23 μ L qPCR MIX + 2 μ L Cell Lysis Buffer 工作液	阴性区
阴性质控	23 μ L qPCR MIX + 2 μ L 热处理提取液	样品制备区
待测样品	23 μ L qPCR MIX + 2 μ L 样品提取液	
阳性质控	23 μ L qPCR MIX + 2 μ L Telomerase positive cells 提取液	

- 加样完成后每孔总体积为 25 μ L。
- 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充分混匀操作。
- 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。

3.2 可按下表进行样品检测排布。

表 5. 96 孔板排版示例

NTC	NTC	NTC							ST6	ST6	ST6	A
热灭-PC	热灭-PC	热灭-PC	PC	PC	PC				ST5	ST5	ST5	B
热灭-S	热灭-S	热灭-S	S	S	S				ST4	ST4	ST4	C
热灭-1/10 S	热灭-1/10 S	热灭-1/10 S	1/10 S	1/10 S	1/10 S				ST3	ST3	ST3	D
									ST2	ST2	ST2	E
									ST1	ST1	ST1	F
												G
												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 (-S 、 -1/10S 、 -PC)；待测样品: S 、 1/10S；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

将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 s 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 min;

95 °C 2 min;

95 °C 15 s, 50 °C 1min, 68 °C 30 s (读取荧光), 35 cycles; 反应体积为 25 μL。

3. qPCR 结果分析

3.1 待测样品端粒酶活性(TPG/reaction)的获取

✧ 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/reaction），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，将 Threshold 设置为 0.05 进行分析，可读取各标准曲线的斜率、截距、相关系数和扩增效率。

✧ 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/reaction。

✧ 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/reaction），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/reaction。

➤ 注意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。

3.2 结果分析说明：

3.2.1 样品每反应的细胞数量的计算公式为：

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

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 1000cell，即 1000cell/reaction

10^5 个 Telomerase positive cells 加 200 μ L 细胞裂解液后，那么此时阳性质控每反应的细胞数量为 1000cell，即 1000cell/reaction。

3.2.2 通过 3.2.1 计算样品每反应的细胞数量，接着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 /reaction），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，1000cell/reaction 的 Telomerase positive cells 靶标基因（FAM）的检测值为 300TPG /reaction，那么也就是每 1000 个阳性细胞对应的端粒酶活是 300TPG。

3.2.3 阳性质控：1000cell/reaction 的阳性细胞内参基因（CY5）Ct 值与标曲及 NTC 的内参基因（CY5）的平均 Ct 值相差不超过 1 个 cycle，且靶标基因（FAM）的检测值 >200 TPG/reaction，则视为阳性质控正常。

3.2.4 无模板对照 NTC 和阴性质控：内参基因（CY5）有检出，且 Ct 值与标曲的内参基因的平均 Ct 值相差不超过 1 个 cycle，此时靶标基因（FAM）无 Ct 值检出，视为阴性对照正常；若 FAM 通道有检出，一般表明检测体系存在污染，需要进行原因排查。

3.2.5 标曲的参数：扩增效率应在 83.3%-110%范围内， $R^2 \geq 0.990$ 。

3.2.6 待测样品：

在阳性质控及无模板对照 NTC 和阴性质控都符合以上实验要求的情况下，

（1）若样品提取液内参基因（CY5）的 Ct 值与标曲及 NTC 内参基因的平均 Ct 值相差不超过 1 个 cycle，则认为该提取液对检测体系不存在抑制效应：

1）此时靶标基因（FAM）无检出，则端粒酶活为阴性；

2）靶标基因（FAM）有检出，则端粒酶活为阳性：

①当待测样品端粒酶活的检测值在标曲线性范围内认为检测值准确、可信；

②当检测值超出定量限时检测值仅供参考，想要获得准确的检测值则需视情况对待测样品提取的细胞数量进行调整。

（2）若超出 1 个 cycle，则认为该提取液对反应体系存在抑制效应，需将样品进行稀释后重新检测。

生效日期：2023 年 09 月 21 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