

天
净
沙
系
列

CAT#:15-00003
低温运输,-20℃保存

BINGENE

人端粒酶活性检测试剂盒 (TRAP PCR 探针法)

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	端粒酶存在于 85-90%的肿瘤组织中，因此通过检测端粒酶活性就能早期诊断大多数肿瘤。目前最常用的检测端粒酶活性的方法就是 TRAP (telomeric repeat amplification protocol，端粒重复片段扩增)，它利用端粒酶能在底物 DNA 末端添加不同数量的 TTAGGG 序列这一特点，通过 PCR 检测延伸产物而高效检测端粒酶活性。本产品基于此原理开发的人端粒酶活性检测试剂盒。它具有以下特征： 1. 一站式，提供从细胞裂解到探针法 qPCR 的所有试剂，免去繁琐的 PCR 后续检测。 2. 一管式操作，端粒酶延伸和探针法 qPCR 在同一体系中完成，方便快捷。 3. 提供改进的的内参，可有效排除 PCR 假阴性。 4. 改良的 TS 模板和 PCR 引物，探针法检测，免去了 TRAP 中常见的引物二聚体的干扰。 5. 既可用于培养细胞，也可用于实体组织。 6. 灵敏度高，最低可以检测到 10 个肿瘤细胞中的端粒酶活性。 7. 本产品足够 50 次 20uL 体系的检测。 8. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品采用小扁盒包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	TRAP 专用细胞裂解液	15-00003a	10 mL	10mL 本色瓶
	探针法 qPCR MasterMix	90805b	1.0 mL	0.5mL 黄盖管
	荧光 PCR 专用模板稀释液	xs15-00003	1.5 mL	1.5mL 本色管
	人 TRAP 检测阳性对照 (10E7 拷贝/μL)	Pc15-00003	50 μL	0.5mL 红盖管
	人 TRAP 检测内参	ic15-111009	250 μL	0.5mL 白盖管
	人 TRAP 模板-引物-探针 混合液	myp15-00003	250 μL	0.5mL 绿盖管
	超纯水	100935	1 mL	1.5mL 蓝盖管
	使用手册	15-00003sc	1 份	无
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。			
自备试剂	蛋白浓度测定试剂盒			
使用方法	一：标准曲线样品的制备 (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/μL 为例)。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。			

1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1，0。
2. 在 0 号管中加入 280 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，35 μ L 本试剂盒提供的人 TRAP 检测内参，震荡一分钟混匀。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45 μ L/管加入到标记的 1-6 号管中，最好用带芯枪头（下同）。
4. 在 6 号管中加入 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的人 TRAP 检测阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品，每个样品中内参的浓度固定为 10^3 拷贝/ μ L。放冰上待用。

二：端粒酶的提取

注意：端粒酶的组成成分中有 RNA，极易被降解，因此，应该跟提取 RNA 一样，尽量在低温条件下快速操作、最好使用固相 RNase 清除剂清洁试验台。在首次使用时，将 100 μ L 本试剂盒提供的人 TRAP 检测内参加入到 TRAP 专用细胞裂解液中，摇匀后分装到 -20 $^{\circ}$ C 长期保存，每次只取所需量。

8. 对冷冻的实体组织：将 50-100mg 冷冻组织在液氮中用预冷的研磨器研磨成粉末，再转移到预冷的玻璃匀浆器中，加入 200 μ L 预冷的 TRAP 专用细胞裂解液，温和手动匀浆数次后冰浴 30 分钟，每间隔数分钟涡旋振荡一次，共 5-6 次，然后直接进入第 3 步操作。为保证裂解效果，可在显微镜下观察确保大部分细胞已经裂解。如果组织样品不足 50-100mg，可以按比例降低 TRAP 专用细胞裂解液的用量。
9. 对新鲜的培养细胞和组织：用自备的预冷 PBS 洗涤 10^5 - 10^6 个经过胰酶处理的细胞或 50-100mg 新鲜组织，3000g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟，弃上清；加入 200 μ L 预冷的 TRAP 细胞裂解液悬浮细胞或组织。对新鲜细胞：涡旋振荡 10 秒后置冰浴 30 分钟，每间隔数分钟涡旋振荡一次，共 5-6 次。对新鲜组织：在冰上用玻璃匀浆器轻柔匀浆后冰浴 30 分钟，每间隔数分钟涡旋振荡一次，共 5-6 次。如果细胞不足 1×10^6 或 50-100mg，可按比例降低 TRAP 裂解液的用量。
10. 12000-14000g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟，收集 160 μ L 上清（含端粒酶）。
11. 取部分上清液用于测定总蛋白浓度。可通过测定 A215 和 A225 计算总蛋白浓度，

计算公式是蛋白质浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = $0.144 \times (A_{215} - A_{225}) \times \text{稀释倍数}$, 也可使用自备的 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。本试剂盒制备的细胞裂解物的总蛋白浓度一般在 10-750 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

12. 测出各样品的蛋白浓度后, 可以根据起始细胞或实体组织用量和最终蛋白量计算出每 μL 裂解液上清所对应的细胞数或实体组织 mg 数。可用 TRAP 专用细胞裂解液将各样品的蛋白浓度 (或所对应的细胞数) 调成一样, 然后分装合适的量放 -80°C 长期保存 (可存放一年)。
13. 对每个裂解液上清, 从上步分装的 N 管中取一管进行热灭活 (95°C 处理 10 分钟灭活端粒酶) 后再放 -80°C 长期保存, 此管将作为该裂解液上清的无端粒酶对照, 可以反复使用。

二: TRAP 反应

14. 确定 TRAP 时每个裂解液上清的使用量: 可以按每个反应加入相同的总蛋白量或其所对应的细胞数或实体组织 mg 数来设置 TRAP 反应。为便于分析比较, 每个 TRAP 反应所用的蛋白量 (或对应的细胞数) 必须一样。如果选择细胞数, 一般不要超过 1000 个细胞/反应。由于样本中一般都有高浓度的不明 Taq DNA 聚合酶抑制物 (TRAP 失败最常见的原因), 因此最佳结果往往是将裂解液上清稀释 10-1000 倍后得到。如果选择稀释, 每个样品的稀释度也需要保持一致。
15. 设置 PCR 反应。如果有 N 各裂解液上清样品, 每个样品做 1 次重复, 则需要设置 $2N+8$ 个 PCR 反应管。多 1 倍是因为每个裂解液上清样品都有一个对应的无端粒酶对照。其中 6 个用于制备标准曲线, 还多出的 2 个样品分别是 TRAP 反应阳性对照和阴性对照。
16. 对 $2N+8$ 个反应, 可在一个离心管中加入 $4 \mu\text{L} \times (2N+9)$ 的超纯水, $10 \mu\text{L} \times (2N+9)$ 的探针法 PCR MagicMix, 最后加入 $4 \mu\text{L} \times (2N+9)$ 人 TRAP 模板-引物-探针混合液, 轻柔吹打混匀后在将混合液分装到 $2N+8$ 个 PCR 管中, 每管分 $18 \mu\text{L}$ 。

17. 最后, 在按下表加入各成分使得总体积为 $20\mu\text{L}$:

成份	N 个样品管	N 个无端粒酶对照管	TRAP 阴性对照	TRAP 阳性对照	标准曲线样品管 1-6
N 个裂解液上清	各 $2\mu\text{L}$	-	-	-	-
N 个裂解液上清的无端粒酶对照	-	各 $2\mu\text{L}$	-	-	-
TRAP 专用细胞裂解液	-	-	$2\mu\text{L}$	-	-
合成的人端粒酶底物	-	-	-	$2\mu\text{L}$	-

	<table><tr><td>第 7 步所得的 6 个标准曲线阳性样品</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>各 2μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)</td></tr></table>	第 7 步所得的 6 个标准曲线阳性样品	-	-	-	-	各 2μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)										
第 7 步所得的 6 个标准曲线阳性样品	-	-	-	-	各 2μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)												
	18. 吹打混匀后进行 PCR 扩增, 扩增条件 (仅供参考, 用户可优化) 如下:																
	<table><tr><td>步骤</td><td>参数</td></tr><tr><td>端粒酶延伸</td><td>30℃ 30 分</td></tr><tr><td>端粒酶灭活</td><td>95℃ 5 分</td></tr><tr><td>第一轮 PCR</td><td>94℃ 30 秒, 55℃ 60 秒, 72℃ 30 秒, 共 6 次循环</td></tr><tr><td>第二轮 PCR</td><td>94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 共 30 次循环 在 72℃采集 FAM 和 ROX 通道的荧光</td></tr><tr><td>最后延伸</td><td>72℃ 3 分, 55℃ 25 分</td></tr></table>					步骤	参数	端粒酶延伸	30℃ 30 分	端粒酶灭活	95℃ 5 分	第一轮 PCR	94℃ 30 秒, 55℃ 60 秒, 72℃ 30 秒, 共 6 次循环	第二轮 PCR	94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 共 30 次循环 在 72℃采集 FAM 和 ROX 通道的荧光	最后延伸	72℃ 3 分, 55℃ 25 分
步骤	参数																
端粒酶延伸	30℃ 30 分																
端粒酶灭活	95℃ 5 分																
第一轮 PCR	94℃ 30 秒, 55℃ 60 秒, 72℃ 30 秒, 共 6 次循环																
第二轮 PCR	94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 共 30 次循环 在 72℃采集 FAM 和 ROX 通道的荧光																
最后延伸	72℃ 3 分, 55℃ 25 分																
	三: 结果分析																
	19. 如果 TRAP 阳性对照的 FAM 信号结果为阴性 (无 Ct 值), 则整个 TRAP 实验无效, 不需要分析数据, 需要重复实验或跟厂家联系。如果 TRAP 阴性对照的 FAM 信号结果为阳性 (有 Ct 值), 说明环境污染, 则整个 TRAP 实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系。对任何 FAM 为阴性的样品, 如果内参的 ROX 信号为阴性 (无 Ct 值), 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。对任何阳性样品, 如果内参的 ROX 信号为阴性 (无 Ct 值), 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。																
	20. 制作标准曲线。以制作标准曲线的 1-6 号阳性对照浓度的 log 值为横轴, 分别以阳性对照 (FAM 通道) 和内参 (ROX 通道) 的 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照的标准曲线为斜线, r2 必须大于 0.95, 内参的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度, 再根据此浓度推算出端粒酶活性的相对值。																
疑难解答	1. 如果样品管有内参信号, 但没有 TRAP 信号, 制备细胞裂解物时可在 TRAP 细胞裂解液中加入 1/100 体积的自备 RNase 抑制剂以抑制 RNase 活性, 并在端粒延伸反应后增加 DNA 纯化一步, 纯化后的 DNA 再用于 PCR (两步法)。可以采用 PCR 产物回收试剂盒纯化。 2. 如果端粒酶灭活对照管出现 FAM 信号, 则可能是 TRAP 扩增产物的污染, 也可能是端粒酶没有彻底灭活, 建议用 RNase 酶解法或酶解+热灭活法灭活端粒酶。																
关联产品	超快核酸银染试剂盒																