|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:221044****低温运输，-20℃保存** |  |
| **逆转录酶活性检测试剂盒****（PERT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**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 逆转录酶活性检测试剂盒（PERT法）以MS2 噬菌体RNA为模板，用反转录引物和待测样品（含逆转录酶）进行逆转录反应，然后再用RT产物为模板进行探针法qPCR检查。通过跟逆转录病毒阳性对照建立的标准曲线对比，即可推算出样品中逆转录酶的浓度。本产品具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供待测样品。
2. 待测样品可以是细胞培养上清液、细胞裂解液和纯化的酶溶液
3. MS2模板、引物和探针经过优化，灵敏性高比同位素法高百万倍，最低可以检测到10个逆转录酶的活性。
4. 产品含逆转录酶阳性对照，便于区分假阴性样品。
5. 体系经过优化，不但可以排除待测样品中DNA聚合酶残留的逆转录活性干扰，还可以排除PCR Mix中Taq DNA聚合酶残留的逆转录活性干扰。
6. 定量检测的线性范围至少为6个数量级。
7. 可以检测deltaretrovirus（原D型逆转录病毒）、gammaretrovirus（原C型逆转录病毒），lentivirus和spumavirus。
8. 提供MgCl2和MnCl2两种溶液，可测试两种不同类别的逆转录酶。
9. 本产品足够50次20uL体系的RT反应和50次20μL体系的探针法PERT反应。
10. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** | 本产品采用十孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| MS2 噬菌体RNA溶液 | pc15-J02467 | 50次 | 0.5mL蓝盖管 |
| MS2 逆转录引物干粉 | Yw15-J02467F | 50次 | 0.5mL红盖管 |
| PERT专用RT Mix | 221044a | 7 μL | 0.5mL黄盖管 |
| MgCl2溶液，25mM | 5-751 | 1mL | 1.0mL蓝盖管 |
| MnCl2溶液，25mM | 930307-5 | 1mL | 1.0mL本色管 |
| PERT逆转录酶样品稀释液 | 221044b | 1 mL | 1.5 mL绿盖管 |
| PERT阳性对照逆转录酶，200U/uL | 221044c | 20uL | 0.5 mL红盖管 |
| MS2 PCR引物-探针混合物（PERT专用）干粉 | Yp15-J02467 | 50次 | 0.5mL本色管 |
| 探针法qPCR MasterMix（PERT专用） | 221044d | 150 μL | 0.5mL棕色管 |
| 超纯水 | 210806 | 1mL | 1.5mL蓝盖管 |
| 使用手册 | 15-23201sc | 1份 | 无 |

注意：首次使用本产品的时候需要在MS2 逆转录引物干粉、MS2 PCR引物-探针混合物（PERT专用）干粉中分别加入超纯水，充分吹打混匀后使用。未用完的需要放-20℃保存。 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 |
| **自备试剂** | 样品（含逆转录酶）。 |
| **使用方法** | 1. **在生物安全柜中准备用于PERT的样品**
2. 细胞培养上清液制备：收集上清液，11000g离心10分钟，0.45um滤膜过滤，100,000g超速离心60分钟。所得沉淀用PERT专用样本悬浮液重悬，放冰上待用。每次可以用5uL。
3. 细胞裂解液制备：将洗涤后的1×10E6细胞沉淀重悬在200uL PERT专用样本悬浮液中，冰上放置20分钟，然后用自备的试剂盒测定蛋白浓度，每次用0.1-1ug。

**二、在超净工作台中稀释制备标准曲线的逆转录酶**（以10个10倍稀释度为例）。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10个离心管，分别为1、2、3、……8，9，10。
2. 用带芯枪头在10个管中分别加入45 μL PERT专用阳性对照稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在1号管中加入5 μL PERT专用阳性对照逆转录酶(试剂盒提供)，轻柔吹打1分钟，不要震荡，得1号稀释液。放冰上待用。此为原液得10E1倍稀释液。
4. 换枪头，在2号管中加入5 μL 1号稀释液，轻柔吹打1分钟，不要震荡，得2号稀释液。放冰上待用。此为原液得10E2倍稀释液。
5. 换枪头，在3号管中加入5 μL 2号稀释液，轻柔吹打1分钟，不要震荡，得3号稀释液。放冰上待用。此为原液得10E3倍稀释液。
6. 重复上面的操作直到得到10个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。稀释的阳性对照逆转录酶在-20℃可保存7天，-80℃可保存1个月。

**三、逆转录（RT）反应预实验测试逆转录酶是Mg依赖型，还是Mn依赖型**1. 如果不知道待测逆转录酶是Mg依赖型还是Mn依赖型，则最好先做预实验检测。如果已经知道，则可以跳过此步。按下表设置4个20uL的RT反应体系：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | Mg+模板 | Mg-模板 | Mn+模板 | Mn-模板 |
| MS2 噬菌体RNA溶液 | 3 μL | 不加 | 3 μL | 不加 |
| MS2逆转录引物 | 2 μL | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| PERT专用RT Mix | 7 μL | 7 μL | 7 μL | 7 μL |
| MgCl2溶液 | 3 μL | 3 μL | 不加 | 不加 |
| MnCl2溶液 | 不加 | 不加 | 3 μL | 3 μL |
| 待测样本（含逆转录酶） | 5 μL | 5 μL | 5 μL | 5 μL |

1. 在PCR仪器上37℃保温5小时。如果不是用PCR仪器，需要加上自备石蜡油放置在5小时保温过程中，反应液蒸发。
2. 各取1-5uL为模板，分别加入10uL 探针法qPCR MasterMix（PERT专用），3uL PERT PCR引物探针混合液，补超纯水到20uL，然后进行qPCR。PCR参数是：37℃ 30分钟、94℃1分钟、（94℃30秒、56℃30秒、72℃30秒）共35个循环。在56℃时采集FAM通道的荧光信号。
3. 比较加Mg和加Mn两组PCR结果，选择后续实验用哪种。

**四**、**逆转录（RT）反应**1. 如果有N个样品，则设置2N+2+6个RT反应，多出的两个一个用于RT阳性对照，一个用于RT阴性对照，多出的6个用于制作标准曲线，另外。按下表设置N+8个20uL的RT反应体系：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | N个样品 | N个无模板对照 | 无样品对照 | 4-10号管（6个标准曲线样本 |
| MS2 RNA溶液（模板） | 各3 μL | 不加 | 3 μL | 各3 μL |
| PERT专用逆转录引物 | 各2 μL | 各2 μL | 2 μL | 各2 μL |
| MgCl2或MnCl2溶液 | 各3 μL | 各3 μL | 3 μL | 各3 μL |
| PERT专用RT Mix | 各7 μL | 各7 μL | 7 μL | 各7 μL |
| 超纯水 | - | 各3 μL | 5 μL | - |
| 待测样本（含逆转录酶） | 各5 uL | 各5 μL | - | - |
| 第8步所得系列稀释液中的第4-第10号 | - | - | - | 各5uL（4号样到4号管，5号样到5号管） |

1. 参考第10步进行RT反应。
2. 参考第11步进行探针法qPCR反应。建议每个样品做三次重复。

**五、数据处理**1. 以阳性对照浓度的log值为横轴，以Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的Ct值从标准曲线上推算出待测样品逆转录酶浓度的log值，再从log值推算出其浓度（单位为U）。
2. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照Ct必须没有读数，或者大于或等于40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct值应该小于40。对待测样品，如果其Ct没有读数、大于或等于40则均为阴性，如果小于40则为阳性。
 |
| **关联产品** | PERT检测阳性对照，200U/uL |

20220609fn