

天
净
沙
系
列

BINGENE

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; 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
MgCl ₂ 溶液, 25mM	5-751	1mL	1.0mL 蓝盖管
MnCl ₂ 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/μL	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	一、在生物安全柜中准备用于 PERT 的样品 1. 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。 2. 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）。 3. 标记 10 个离心管，分别为 1、2、3、……8，9，10。 4. 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）。 5. 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。 6. 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。 7. 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。 8. 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 9. 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

10. 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。
11. 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。
12. 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

13. 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）

14. 参考第 10 步进行 RT 反应。
15. 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 16. 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）。 17. 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