天净沙系列

CAT#:221044yd

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 逆转录酶活性检测试剂盒（药典法）

# Reverse Transcriptase Assay

## 使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

本产品是根据药典提供的逆转录酶活性测定方法开发的逆转录酶活性检测试剂盒。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供待测样品。
2. 起始样本可以是细胞培养上清液、细胞裂解液和纯化的逆转录酶溶液，可以检测到里面所含有的逆转录酶活性，并由此判断是否有逆转录病毒的存在。
3. 含逆转录酶阳性对照，便于制备标准曲线和排除假阴性实验。
4. 本产品提供满足 2020 年中国药典要求的 PCR 引物、探针。但本不提供噬菌体 MS2 RNA 模板。
5. 本产品足够 50 次 25 μL 体系的 PERT 反应。
6. 本产品只能用于科研，包括生物制品和细胞库等质检环节。

## 规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

| 成分 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 药典法专用 PERT 样品稀释液 | 221044yd-a | 12 mL | 15 mL 本色瓶 |
| 药典法专用 PERT 样品保存液 | 221044yd-b | 12 mL | 15 mL 本色瓶 |
| MMLV 逆转录酶，200 U/μL<br>比活：见标签 | 220628 | 20 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 药典法专用 PERT 引物-探针干粉 | yp15-221044yd | 50 次 | 0.5 mL 棕塑管 |
| 药典法专用 PERT RNA 模板干粉 | 221044yd-v2 | 50 次 | 0.5 mL 白盖管 |
| 药典法专用 PERT 反转录缓冲液 | 221044yd-c | 500 μL | 0.5 mL 绿盖管 |
| 药典法专用 PERT 扩增缓冲液 | 221044yd-d | 500 μL | 0.5 mL 绿盖管 |
| 使用手册 | sc221044yd | 1 份 | 无 |

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。PERT RNA 模板干粉在使用前需要短暂离心，然后在管中加入 110 μL 超纯水，涡旋振荡 30 秒，然后将该管置于冰上备用，如需长期保存则放置于-80℃

## 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、超纯水、蛋白浓度测定试剂盒、DEPC 处理的 5% TritonX-100 2 μL

## 使用方法

**一、 在生物安全柜中准备用于 PERT 的样品**

1. 取供试品 200 μL，每分钟 5000 转离心 5 分钟，取上清液 100 μL，加入药典法专用 PERT 样品保存液 100 μL 和 DEPC 处理的 5% TritonX-100 2 μL，混匀后，置冰浴 15 分钟后，置-70℃保存备用。

**二、制备 MMLV 逆转录酶的梯度稀释液**

2. 取 0.5 μL 本试剂盒提供的 MMLV 逆转录酶（200 U/μL）加至 99.5 μL 药典法专用 PERT 样品稀释液中，上下吹打 10 次并涡旋混匀，即 MMLV 逆转录酶稀释为 1E12 pU/μL（1 U/μL）。以此样本为初始样本，取 5 μL 至 45 μL 药典法专用 PERT 样品稀释液中，上下吹打 10 次并涡旋混匀，如此方法进 10 倍系列稀释至 1E3 pU/μL，每次稀释时均采用新吸头吸取样本。
3. 取 1E4~1E9 pU/μL 稀释度的 MMLV 逆转录酶作标准曲线各点。1E4 pU/μL 稀释度样本作为灵敏度对照。置冰浴备用。

**三、设置 PERT 反应**

4. 首次使用本产品时，请将 PERT RNA 模板溶液管涡旋震荡 30 秒混匀后放冰上待用。没用完的模板溶液需放-80℃保存。将已处理的供试品用药典法专用 PERT 样品稀释液做 10 倍稀释。
5. 反转录管中加入药典法专用反转录缓冲液 19.7 μL，PERT RNA 模板溶液 0.3 μL，混匀后，标记，70℃放置 10 分钟，置冰浴。
6. 在相应的反转录反应管中分别加入 5 μL 已稀释的标准曲线样品、供试品、阳性对照及灵敏度对照，以药典法专用 PERT 样品稀释液作阴性对照。反转录反应体系为 25 μL。37℃反应 4 小时
7. 取反转录产物 5 μL 加至实时荧光 PCR 扩增缓冲液 25 μL 中，反应总体系为 30 μL。混匀后，按下列条件进行扩增：37℃ 7 钟，预变性 95℃ 5 分钟，然后 95℃ 20 秒，57℃ 60 秒，72℃ 10 秒，进行 50 个循环，在 57℃时采集信号，最后 72℃延伸 2 分钟。

**五、 数据处理**

8. 实验方法灵敏度认可标准：灵敏度分析：分别检测 1E4 pU/μL、1E3 pU/μL 供试品各 10 个重复。至少 1E4 pU/μL 的供试品应全部检出（10/10），实验方法的灵敏度为合格。
9. 待测样本结果判定：如果待测样本无 Ct 值结果，或 Ct 值≥40，且无明显的扩增曲线，则判定待测样本中逆转录酶活性为阴性；如果待测样本的 Ct 值结果＜40，且有明显的扩增曲线则可进入下一步。
10. 制作标准曲线：以 MMLV 逆转录酶标准品的浓度（pU/μL，不是 U，下同）的 log 值为横轴，以 FAM 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，标准曲线 R 应不低于 0.960，阳性对照应为阳性，Ct 值应≤28；灵敏度对照应为阳性，Ct 值应≤38；视为试验有效。
11. 待测样本中逆转录酶活性单位（pU/mL）= A × D × 1000。A 为测定值，pU/μL；

| | |
|---|---|
| | D 样本稀释倍数，D=20。<br>注：如供试品为培养细胞，则将细胞传代后，培养 3~4 天长成单层，取上清液检测，取供试品前不得换，试验中所有试剂及吸头均需灭菌。与 RNA 操作有关的试剂及材料均需经过 DEPC 处理。标准品稀释时，用新吸头吸取上一个稀释度样本加至下一个稀释管中，反复吹吸 10 次，并涡旋混合均匀，然后换新吸头进行下一个稀释。与样本相关的操作建议使用带滤芯吸头，并注意实验分区。定期对各区进行消毒，PCR 产物及其加供试品吸头应及时进行有效处理。 |
| **关联产品** | DNA 聚合酶 RT 残留活性抑制剂 |

20250926ztl