天净沙系列

CAT#:240205

低温运输，-20℃保存

天净沙

MMLV 逆转录酶活性检测试剂盒（RT-PCR 法）

MMLV Reverse Transcriptase Assay（RT-PCR）

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 MMLV 逆转录酶活性检测试剂盒，其原理是用待测样品代替 MMLV 逆转录酶进行 RT-PCR，通过标准品制备的标准曲线计算出样品中是否存在 MMLV 逆转录酶以及其浓度，进而推算出样本是否含有 MMLV 逆转录病毒及其浓度。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供待测样品。
2. 操作简单快捷，一步加样操作，变异系数小，适合高通量操作。
3. 实时荧光检测，一管式反应，避免样本交差污染。
4. 灵敏性高，最低可以检测到几十个 MMLV 逆转录酶分子的活性。
5. 背景低，本产品所用的 DNA 聚合酶不含背景 MMLV 逆转录酶活性，使用的 RNA 模板在生命周期中无 DNA 环节，不会自带污染源。
6. 起始样本可以是细胞培养上清液、细胞裂解液和纯化的 MMLV 逆转录酶溶液，可以检测到里面所含有的 MMLV 逆转录酶活性，并由此判断是否有逆转录病毒的存在。
7. 含 MMLV 逆转录酶阳性对照，便于制备标准曲线和排除假阴性实验。
8. 定量检测的线性范围至少为 6 个数量级。
9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的 RT-PCR 反应。
10. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
MMLV RT-PCR 样品稀释液	240205a	12 mL	15 mL 本色瓶
MMLV 逆转录酶，200 U/μL 比活：见标签	221033	20 μL	0.5 mL 红盖管
MMLV 活性检测引物-探针干粉	yp240205	50 次	1.5 mL 棕色管
RT-PCR RNA 模板干粉	240205v2	50 μL	0.5 mL 黄盖管
2×PERT MasterMix	221044b	500 μL	0.5 mL 绿盖管
使用手册	240205sc	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。RT-PCR 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 RNA、超纯水、蛋白浓度测定试剂盒。

使用方法

一、在生物安全柜中准备用于 RT-PCR 的样品

1. 细胞培养上清液制备：收集上清液，11,000×g 离心 10 分钟，0.45 μm 滤膜过滤，100,000×g 超速离心 60 分钟得病毒颗粒。用 RT-PCR 样本稀释液重悬病毒颗粒后放冰上待用，此为待测样本。每次 RT-PCR 实验可以用 1-5 μL 待测样本。
2. 细胞裂解液制备：将用预冷的 PBS 洗涤后的 1E6 个细胞沉淀重悬在 200 μL RT-PCR 样本稀释液中，冰上放置 20 分钟裂解细胞。用自备的试剂测定蛋白浓度，每次 RT-PCR 实验需要用 0.1-1 μg 蛋白样本。

二、制备 MMLV 逆转录酶的梯度稀释液（以 10 个 10 倍稀释度为例）

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 RT-PCR 样本稀释液。
5. 在 1 号管中加入 5 μL MMLV 逆转录酶（200 U/μL，试剂盒提供），轻柔吹打 1 分钟得 1 号稀释液，放冰上待用。此为原液的 1E1 倍稀释液，浓度为 20 U/μL。
6. 换枪头，在 2 号管中加入 5 μL 1 号稀释液，轻柔吹打 1 分钟得 2 号稀释液。放冰上待用。此为原液的 1E2 倍稀释液，2 U/μL。
7. 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。一般第一次实验时先选用 3-8 号稀释液共 6 个样本，然后根据结果再决定后续实验是用更低还是更高稀释度的样本。上述稀释的酶标准品在-20℃至少可保存 3 个月。

三、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 首次使用本产品时，请将 RT-PCR 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。
9. 如果有 N 个待测样本，做 6 个点的标准曲线，则标记 N+7 个反应管，其中 N 个管用于 N 个待测样本，多出的 1 个管用于无样本阴性对照，6 个用于制作标准曲线（也相当于阳性对照）。按下表加入各成分：

成分	无模板对照	无样本对照	N 个样品管	6 个标曲管
RT-PCR RNA 模板溶液	不加	10 μL	各 10 μL	各 10 μL
MMLV RT-PCR 样本稀释液	2 μL	2 μL	不加	不加
MMLV 活性检测引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL	各 3 μL
超纯水	5 μL	3 μL	各 3 μL	各 3 μL
N 个待测 RNA 样本	不加	不加	各 2 μL	不加
第 8 步所得 MMLV 标准品的 3-8 号稀释液	不加	不加	不加	各 2 μL（需加入到所对应的管中）

2×PERT MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	各 10 μL

注：如果样本含 DNA 聚合酶，由于部分 DNA 聚合酶也有微弱的 RT 活性，故无 MMLV 逆转录酶的样本也可能出现阳性结果。用户可以在每管中加入 2 μL DNA 聚合酶 RT 活性抑制剂予以屏蔽（同时少加 2 μL 超纯水）。该产品需另购。

10. 在 PCR 仪上进行如下反应：42℃ 10 分钟，95℃ 5 分钟，（95℃15 秒、52℃ 30 秒、72℃ 30 秒）循环 35 次循环。注：如需提高检测极限，可延长逆转录时间至 100 分钟，循环数可尝试 45 循环。

四、数据处理

11. 实验有效性判断：如果无模板对照或无样本对照出现了 Ct 值并且荧光信号有标准的倒 S 扩增曲线，则说明试剂或环境有污染，则整个实验无效。如果所有阳性对照（标曲管）均无扩增，则说明试剂、仪器或操作有问题，则整个实验也无效。实验无效时需要先找到原因后再继续实验。如果实验有效，可继续后续的分析。
12. 制作标准曲线：以 MMLV 逆转录酶标准品的浓度（p U/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。
13. 用 N 个待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出其对应 MMLV 逆转录酶浓度的 log 值，再用 log 值计算其对应的 MMLV 逆转录酶浓度，再根据体积计算出使用的活力单位。
14. 如果知道所测 MMLV 逆转录酶的重量，则可以计算出其比活（活性单位/mg）。本批次提供的 MMLV 逆转录酶的比活见标签。
15. 如果知道所测 MMLV 逆转录酶的分子量，还可以计算出每个 MMLV 逆转录酶分子有多少活性单位。假设测出某 MMLV 逆转录酶样本比活为 36500 U/mg，由于常用的 MMLV 逆转录酶分子量为 73 kDa，则 1 mg MMLV 逆转录酶的摩尔数为 1/7.3E7，其对应的分子数为 6.02E23×（1/7.3E7）=8.24E15。由于 1 mg 的活力为 35600 U，故每个 MMLV 逆转录酶分子对应 36500 U/8.24E15=4.43E-12 U=4.43 pU。
16. 如果知道每个 MMLV 病毒颗粒含多少个 MMLV 逆转录酶分子，可以计算出每个病毒颗粒有多少逆转录单位。根据文献，每个逆转录病毒颗粒约含 X 个 MMLV 逆转录酶分子，每个鼠逆转录病毒颗粒和人 MMLV 病毒颗粒约有 70-80 个 MMLV 逆转录酶分子。故每个 MMLV 病毒颗粒有 4.43×70=310.1 pU

关联产品	DNA 聚合酶 RT 残留活性抑制剂