天净沙系列

CAT#:15-104-Tel
低温运输，-20℃保存

天净沙

鹅端粒酶活性检测试剂盒（TRAP PCR 探针法）

Anser anser Telomerase Activity Kit

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

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有可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。但是传统的 TRAP 方法为终点电泳检测法，灵敏度低，没法定量，同时还容易产生气溶胶污染。为克服这些缺点，本公司开发基于探针法 qPCR 的 TRAP 试剂盒。它有以下特征：

1. 即开即用，提供从细胞裂解到 qPCR 所有试剂，免去自己优化条件。
2. 基于探针法荧光定量 PCR，比电泳法 TRAP 灵敏度高。
3. 使用探针，专一性比电泳法 TRAP 高。
4. 引物和探针经过优化，灵敏度高，最低检测限可达 100 拷贝/反应。
5. 提供阳性对照，可以进行基于此对照的定量分析。
6. 一管式操作，免去气溶胶污染之忧。
7. 既可用于定量，又可用于定性。用于定量时线性范围至少有 5 个数量级。
8. 既可用于培养细胞，也可用于实体组织（包括肿瘤组织）。
9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的 TRAP PCR 检测。
10. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
TRAP 专用细胞裂解液	15-104-Tel a	10 mL	10 mL 本色瓶
2×TRAP 专用 qPCR MasterMix	15-104-Tel b	0.5 mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1.0 mL	1.5 mL 绿盖管
鹅 TRAP 检测阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	pc15-104-Tel	50 μL	0.5 mL 黄盖管
鹅端粒酶底物干粉	yw15-104-Tel dx-TS	50 次	0.5 mL 白盖管
鹅 TRAP 引物-探针干粉	yp15-104-Tel dx	50 次	0.5 mL 棕色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	15-104-Tel sc	1 份	无

注意：首次使用本产品时需要在鹅端粒酶底物干粉中加入 55 μL 的超纯水；鹅 TRAP 引物-探针干粉管中加入 165 μL 的超纯水。分别涡旋震荡 1 分钟溶解，短暂离心后放冰上待用。每次没有用完的需要放-20℃保存。

运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 12 个月。
自备物品	BCA 蛋白浓度测定试剂盒，固相 RNase 清除剂。
使用流程	**一：标准曲线样品的制备** 以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 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，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。 2. 在 1-6 号管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的鹅 TRAP 检测阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 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。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，极容易被降解，因此，提取端粒酶应该跟提取 RNA 一样，尽量在低温条件下快速操作、最好使用本公司的固相 RNase 清除剂预先清洁试验台面等容易有 RNase 污染的地方。 7. 对冷冻的实体组织： 将 50-100 mg 在-80℃冷冻的组织中加入 200 μL 预冷的 TRAP 专用细胞裂解液后超声处理，或放在装有液氮的研钵中研磨成粉末，再转移到预冷的玻璃匀浆器中，加入 200 μL 预冷的 TRAP 专用细胞裂解液，温和手动匀浆 6 次后冰浴 30 分钟，每间隔 5 分钟涡旋振荡一次，然后直接进入第 9 步操作。 注意：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 50-100 mg，可以按比例降低 TRAP 专用细胞裂解液用量。在-20℃保存的实体组织放置 2 个月后就失去端粒酶活性，而在-80℃保存的实体组织放置数年还有端粒酶活性。 8. 对新鲜的培养细胞和组织：用自备的预冷 PBS 洗涤 1E6 个经过胰酶处理的细胞或 50-100 mg 经过胰酶处理的新鲜组织，3000×g 4℃离心 5 分钟，弃上清，细胞沉淀可以直接使用，也可以放-80℃保存后续使用。在细胞或组织沉淀中加入 200 μL 预冷的 TRAP 专用细胞裂解液，轻柔吹打 3 次悬浮细胞或组织。对新鲜细胞：

涡旋振荡 10 秒后置冰浴 30 分钟，每间隔 5 分钟涡旋振荡一次。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 5 分钟涡旋振荡一次。如果细胞不足 1E6 或 50-100 mg，按比例降低 TRAP 专用细胞裂解液用量。

9. 14000×g 4℃离心 20 分钟，收集 160 μL 上清（含端粒酶），留 40 μL 不取。

10. 取部分上清液用自备 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。

11. 测出各样品的蛋白浓度后，用 TRAP 专用细胞裂解液将各样品的蛋白浓度调成 3 μg/μL，然后分装合适的量到离心管中，将实验所需的数量放冰上待用，其余的放-80℃长期保存（可存放一年）。此步所得样本称为端粒酶待测样本。

12. 对每个样本，一次实验需要两管，一管用于测定端粒酶活性，一管用作该待测样本的热灭活阴性对照。制备方式是每个样本取一管端粒酶待测样本，95℃处理 10 分钟灭活端粒酶，放冰上待用。没有用完的可放-80℃长期保存（可存放一年）供下次使用（某些样品可能需要适量加入甘油后进行保存）。

三：探针法 TRAP（20 μL 体系）

13. 确定端粒酶待测样本的：为便于比较，每个反应所用的蛋白量总量（或对应的细胞数）必须一样，否则不好进行样本间的比较。

14. 设置反应。如果有 N 个样品，每个样品做 1 次重复（一般建议作三个重复，此处为表述方便，假设只做 1 次重复），则需要准备 2N+6 个反应管。多 1 倍是因为每个样本都需要一个对应的热灭活阴性对照。另外 1 个用作探针法 TRAP 阴性对照，最后 5 个用于标准曲线样本。按下表设置 20 μL 体系的探针法 TRAP:

成份	N 个 样品管	N 个热灭活阴性对照管	探针法 TRAP 阴性对照	标准曲线样品管（1-6 管）
鹅端粒酶底物溶液	各 1 μL	各 1 μL	1 μL	1 μL
第 11 步所得 N 个端粒酶待测样本	各 1 μL	-	-	-
第 12 步所得 N 个热灭活阴性对照样本	-	各 1 μL	-	-
TRAP 专用细胞裂解液	-	-	1 μL	1 μL
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）				各 5 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 管…）
鹅 TRAP 引物-探针混合液	各 3 μL	各 3 μL	3 μL	3 μL
2×TRAP 专用 qPCR MasterMix	各 10 μL	各 10 μL	10 μL	10 μL
超纯水	各 5 μL	各 5 μL	5 μL	-

15. 吹打混匀后上机进行端粒延伸和 PCR 扩增，反应参数如下：

过程	温度	时间
端粒延伸	30℃	30 min
预变性	95℃	5 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	57.5℃	15 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 MGB）
注：若使用 ABI 7500 qPCR 仪，复性温度 57.5℃需改为 48℃，若使用赛默飞 SQ5 仪器复性温度 57.5℃需改为 48℃，时间 30s。		

四：结果分析

16. 实验的有效性判断：如果标准曲线样本管的 FAM 信号结果为阴性（无 Ct 值，或者大于或等于 40），则整个实验无效，不需要分析数据，需要重复实验或跟厂家联系。如果探针法 TRAP 阴性对照管的 FAM 信号结果均为阳性（有 Ct 值小于 40），说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。如果标准曲线样本管的 FAM 信号结果为阳性，探针法 TRAP 阴性对照管的结果为阴性，则实验有效，可以进入下步分析。

17. 标准曲线制作：以 5 个标准曲线样本浓度的 log 值为横轴，以阳性对照（FAM 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。再以待测端粒样品的 Ct 值从阳性对照的标准曲线上推算出待测端粒酶所合成的端粒重复序列的拷贝数的 log 值，再有此 log 值推算出新合成的端粒重复序列拷贝数。由于新合成的端粒 DNA 重复序列的拷贝数跟端粒酶的活性相关。因此端粒酶活性大小跟测试的 Ct 呈现反相关，同一次实验所得的 Ct 值可以用来比较各所测各样本中端粒活性的相对大小。

关联产品	端粒长度检测试剂盒