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）

Reverse Transcriptase Assay（PERT）

使用手册 V1.42

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

WHO 规定生物制品中不能含有逆转录病毒污染，逆转录病毒种类繁多，故一般通过检测逆转录酶活性来间接检测逆转录病毒存在与否。药典规定的检测逆转录酶的方法是 PERT 法（Product-Enhanced Reverse Transcription），其原理是用待测样品代替逆转录酶进行 RT-PCR，通过标准品制备的标准曲线计算出样品中是否存在逆转录酶以及其浓度，进而推算出样本是否含有逆转录病毒及其浓度。PERT 法根据酶活性检测，普适性广，可检测出 oncovirus、lentivirus 和 spumavirus 等几大类已知和未知的逆转录病毒。但常规 PERT 法是两步法 RT-PCR 加电泳检测，操作繁琐，误差大，不适合高通量操作。为克服此缺点，本公司开发了一管式实时 PERT 试剂盒。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需提供待测样品，一步加样操作，变异系数小，适合高通量操作。
2. 实时荧光检测，一管式反应，避免样本交差污染。
3. 灵敏性高，最低可以检测到几十个逆转录酶分子的活性。
4. 可用于测定 Bst，RTx 逆转录活性，但不适用于 Tth 逆转录活性测定。
5. 背景低，本产品所用的 DNA 聚合酶不含背景逆转录酶活性，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。
7. 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。
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 PERT 反应。
10. 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
PERT 样品稀释液	221044a	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
PERT 引物-探针干粉	yp15-221044ba	50 次	0.5 mL 棕色管
PERT RNA 模板干粉	221044v2	50 次	0.5 mL 白盖管
2×PERT MasterMix	221044b	500 μL	0.5 mL 绿盖管
使用手册	221044sc	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
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，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 30 μL PERT 样本稀释液重悬病毒颗粒后放冰上待用，此为待测样。每次 PERT 实验可以用 1-5 μL 待测样本。如果结果在线性范围之外，则需要将样本稀释，使其结果在线性范围之内。注意：如果没有超速离心机，也可不进行超离富集，可尝试使用初步离心过滤的溶液进行测试，结果在线性范围内即可。 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 PERT 样本稀释液中，冰上放置 20 分钟裂解细胞，11,000×g 离心 10 分钟取上清。用自备的试剂测定上清蛋白浓度，每次 PERT 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 PERT 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、设置 PERT 反应** 8. 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。 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
PERT 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL	各 3 μL
PERT RNA 模板溶液	-	2 μL	各 2 μL	各 2 μL
PERT 样本稀释液	2 μL	2 μL	-	-
超纯水	5 μL	3 μL	各 3 μL	各 3 μL

N 个待测样本	-	-	各 2 μL	-
第 8 步所得 MMLV 标准品的 3-8 号稀释液	-		-	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

注意：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。注意：42℃是本产品提供的 MMLV 逆转录酶标准品的最适温度，用户可根据待测逆转录酶的最适温度调整。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。

五、 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逆转录酶浓度的 log 值，再用该 log 值计算出其对应的逆转录酶浓度，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. 如果知道所测逆转录酶的分子量，还可以计算出每个逆转录酶分子有多少活性单位。假设测出某 AMV 逆转录酶样本比活为 36500 U/mg，由于 AMV 逆转录酶的分子量为 158 kDa，则 1mg AMV 逆转录酶的摩尔数为 1/1.58E8，其对应的分子数为 6.02E23×（1/1.58E8）=3.81E15。由于 1 mg 的活力为 36500 U，故每个 AMV 逆转录酶分子对应 36500 U/3.81E15=0.96E-11 U=9.6 pU。常用的 MMLV 逆转录酶的分子量为 78 kDa，HIV-1 逆转录酶分子量为 117 kDa。
16. 如果知道每个 AMV 病毒颗粒含多少个逆转录酶分子，可以计算出每个病毒颗粒有多少逆转录单位。根据文献，每个禽类逆转录病毒（包括 AMV 病毒）颗粒约含 70 个逆转录酶分子，每个鼠逆转录病毒颗粒和人 HIV 病毒颗粒约有 70-80 个逆转录酶分子。故每个 AMV 病毒颗粒有 9.6×70=673 pU。

关联产品	DNA 聚合酶 RT 残留活性抑制剂

20240119dx-20260316wjw