

逆转录酶活性检测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 说明书

货号：1505700

版本：B/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

逆转录酶活性检测试剂盒，符合《中国药典》 0234 生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制（附录 1 逆转录酶活性检查法），利用 MS2 RNA 为模板，经反转录后再采用荧光探针 qPCR 技术检测特异性扩增信号。

试剂盒适用于生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定过程；但鸡胚成纤维细胞（CEF）或其他禽源性细胞、小鼠及其他啮齿类动物来源的细胞系常含有逆转录病毒基因序列，其逆转录酶活性检测常为阳性。对此，建议按照法规要求采用其他方法进行相应检测。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
M-MLVRT 定量参考品	NNA024	6 μL × 1 管	-18 °C及以下
反转录 Buffer	NNB010	1 mL × 1 管	-18 °C及以下，避光
MS2 Primer & Probe MIX	NNC036	150 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
2×qPCR SHENmix	NNC045	1 mL × 1 管	-18 °C及以下，避光
100×ROX	NND007	20 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
ddH ₂ O	NND010	1 mL × 1 管	-18 °C及以下
MS2 RNA	NND011	15 μL × 1 管	-18 °C及以下
A 液	NND012	1.5 mL × 2 管	-18 °C及以下
B 液	NND013	750 μL × 1 管	-18 °C及以下

备注：100×ROX 解冻后于 2-8 °C、避光保存。

■ 规格

50 Reactions

■ 有效期

规定储存条件下 12 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- LineGene 9600 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 10 mg/mL RNase A, 用户自备
- 阳性对照品, 联系本公司订购 (逆转录酶活性检测阳性对照 PC, 货号: 1505701)
- 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管
- qPCR 反应板或八联管
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L RNase Free 低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 移液枪

■ 操作过程

❖ M-MLVRT 定量参考品稀释、标曲样品和灵敏度供试品准备

M-MLVRT 定量参考品浓度 (200 U/ μ L) 标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 A 液将 M-MLVRT 定量参考品进行 10 倍梯度稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 M-MLVRT 定量参考品和 A 液置于冰上或 2-8 $^{\circ}$ C 条件下融化。待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 秒, 如此重复 3 次。
2. 取 9 支无菌的 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8。
3. 在 ST0 管中加入 398 μ L A 液, 其余各管分别加入 45 μ L A 液。
4. 直接吸取 2 μ L 的 M-MLVRT 定量参考品, 加入 ST0 管中液面以下, 反复吹吸 10 次后弃去枪头, 瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 重复振荡离心 2 次以确保充分混匀, 混匀的 ST0 管可于 -18 $^{\circ}$ C 以下稳定保存 1 个月。
5. 按表 2 依次进行稀释, 吸头直接吸液后, 加入液面下反复吹吸 10 次后弃去枪头, 瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 重复振荡离心 2 次以确保充分混匀。

表 2. M-MLVRT 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (pU/μL)
ST0	2 μL M-MLVRT (200 U/μL) + 398 μL A 液	10 ¹²
ST1	5 μL ST0 + 45 μL A 液	10 ¹¹
ST2	5 μL ST1 + 45 μL A 液	10 ¹⁰
ST3	5 μL ST2 + 45 μL A 液	10 ⁹
ST4	5 μL ST3 + 45 μL A 液	10 ⁸
ST5	5 μL ST4 + 45 μL A 液	10 ⁷
ST6	5 μL ST5 + 45 μL A 液	10 ⁶
ST7	5 μL ST6 + 45 μL A 液	10 ⁵
ST8	5 μL ST7 + 45 μL A 液	10 ⁴

6. 标准曲线为 ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8。可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度点。

7. 用户首次使用本产品应进行检测系统灵敏度测试, 灵敏度供试品为 ST8, 反转录重复 10 管, qPCR 每管各检测 1 孔, 共 10 孔。

❖ 供试品的准备

取供试品 200 μL, 5000 转/分钟, 离心 5 分钟, 取上清液 20 μL, 加入 B 液 20 μL, 混匀后, 置冰浴 15 分钟, 此为已处理供试品, 置-65 °C 保存备用。

反转录供试品准备: 取已处理供试品 5 μL, 加入 45 μL A 液中, 反复吹吸 10 次混匀, 瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 重复振荡离心 2 次以确保充分混匀。检测时根据需要, 可依次连续稀释至合适的浓度。

❖ 阳性对照品、阴性对照品的准备

1. 阳性对照品: 联系本公司订购。依照供试品的准备步骤处理, 按单次用量分装, 置-65 °C 保存备用。

2. 阴性对照品: A 液。依照供试品的准备步骤处理。

❖ 反转录反应液 (RT-MIX) 的准备和反转录

1. 根据待检测样品的数量 (N), 计算所需反应管数。

RT 反应管数 = 6 个浓度梯度的标准曲线 + N 个供试品 + 1 个阴性对照品 + 1 个阳性对照品 (首次使用时应额外增加 10 管灵敏度供试品)

2. 根据反应管数计算所需反转录反应液的总量（含有 2 孔的损失量）：

$$\text{RT-MIX} = (\text{RT 反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L}$$

3. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化，轻微振荡混匀，根据表 3 所示准备 RT-MIX：

表 3. RT-MIX 配制表

组分	单孔反应
反转录 Buffer	19.7 μL
MS2 RNA	0.3 μL
总体积	20 μL

4. 将 RT-MIX 置于 70 °C 孵育 10 分钟后，立即置于冰上至少 5 分钟后，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒，重复振荡离心 2 次以确保充分混匀，然后 20 μL /管分装于 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管或 PCR 联管或 96 孔板中。

5. 按表 4 所示加样，移取相应样品，加入 RT-MIX 中，反复吹吸 10 次后弃去枪头，盖紧管盖或密封，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s。加样完成后每管总体积为 25 μL 。

表 4. 各反应管加样示例

标准曲线样品	20 μL RT-MIX + 5 μL ST3/ST4/ST5/ST6/ST7/ST8
灵敏度供试品	20 μL RT-MIX + 5 μL ST8（重复 10 管，首次应做）
供试品	20 μL RT-MIX + 5 μL 反转录供试品
阳性对照品	20 μL RT-MIX + 5 μL 阳性对照品
阴性对照品	20 μL RT-MIX + 5 μL 阴性对照品

6. 反应管置于 37 °C，4 小时后，得到反转录产物，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒，可立即进行 qPCR 反应检测，或 -20 °C 保存过夜，次日检测。

❖ qPCR 反应液的制备和加样

1. 根据 RT 反应管数，计算所需 qPCR 反应孔数，一般每个 RT 反应管做 3 个重复孔：

$$\text{qPCR 反应孔数} = \text{RT 反应管数} \times 3$$

2. 根据反应孔数计算所需 qPCR MIX 的总量（含 2 孔的损失量）：

$$\text{qPCR MIX} = (\text{qPCR 反应孔数} + 2) \times 25 \mu\text{L}$$

3. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化，轻微振荡混匀，根据表 5 所示准备 RT-qPCR MIX：

表 5. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
2×qPCR SHENmix	15 μL
MS2 Primer & Probe MIX	3 μL
RNase A（10 mg/mL，用户自备）	1 μL
100×ROX	0-0.3 μL
ddH ₂ O	补足总体积 25 μL

注意：

qPCR MIX 中含有 *RNase A*，其配制与加样应与反转录操作区域有效隔离。

ROX 的用量应根据 *qPCR* 仪器厂家型号由用户自行确定，如 *7500 Real-Time PCR System* 型用量 0.1 μL，*CFX96 Real-Time PCR System* 型用量 0 μL。

4. 可参照表 6 所示将 *qPCR MIX* 25 μL/孔分装于 96 孔板中，移取 5 μL 反转录产物加入相应孔中。加样完成后每孔总体积为 30 μL。

表 6. 96 孔板排版示例

PC				S1	S1	S1			ST3	ST3	ST3	A
PC				S2	S2	S2			ST4	ST4	ST4	B
									ST5	ST5	ST5	C
									ST6	ST6	ST6	D
								ST8-RT7	ST7	ST7	ST7	E
								ST8-RT8	ST8	ST8	ST8	F
NC								ST8-RT9	ST8-RT1	ST8-RT2	ST8-RT3	G
NC								ST8-RT10	ST8-RT4	ST8-RT5	ST8-RT6	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- ✧ 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的逆转录酶标准曲线（ST3-ST8）、10 个灵敏度 ST8（来自 10 个反转录反应 RT1、RT2、RT3.....RT10）、1 个阳性对照 PC、1 个阴性对照 NC、2 个待测样品（S1 和 S2）。除灵敏度外其余每个检测做 3 个 qPCR 重复孔。
- ✧ 实际检测时可根据样品多少，参照此示例样进行 96 孔板排版加样。
5. 将 96 孔板用光学膜封闭，快速离心 20 秒后放入 qPCR 仪。

❖ qPCR 程序设置

✧ SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
3. 选择步骤 2: 选择项目中的“**逆转录酶活性检测**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

✧ 其他定量 PCR 系统程序设置如下:

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针, 命名为 RT, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 检测参比荧光为 ROX (可选)。
3. 设置反应程序: **37 °C 7 min; 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 20 s, 57 °C 1 min (读取荧光), 72 °C 10 s, 50 个循环; 最后 72 °C 延伸 2 min;** 反应体积 30 μL 。

❖ qPCR 结果分析

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, 设为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 (单位为 pU/ μL), 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST3、ST4、ST5、ST6、ST7、ST8。
2. 待测样品将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。
3. 在“实验分析”页面点击 , 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。
4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值, 设为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 (单位为 pU/ μL), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST3、ST4、ST5、ST6、ST7、ST8。
3. 在 Results 的 Plate 面板中, 将灵敏度检测孔、阳性对照 PC 孔、阴性对照 NC 孔、供试品孔、加标质控样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名, 之后进行数据分析。

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取各检测值，单位为 pU/μL。结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

❖ 结果判定

1. 实验方法灵敏度认可标准

10 个 10^4 pU/μL（ST8）供试品应全部检出，实验灵敏度合格。

2. 试验有效性

标准曲线 R^2 不低于 0.96，阳性对照 $Ct \leq 28$ ；灵敏度供试品 $Ct \leq 38$ ，视为试验有效。

3. 待测样品结果判定

（1）如果待测样品无 Ct 值结果，或 Ct 值 ≥ 40 ，且无明显的扩增曲线，则判定待测样品中逆转录酶活性为阴性。

（2）如果待测样品 Ct 值 < 40 ，且有明显的扩增曲线，则按照下式计算样品中逆转录酶活性单位：

待测样品中逆转录酶活性单位（pU/mL）= $A \times D \times 1000$

式中 A 为测定平均值，pU/μL；D 为样品稀释倍数， $D=20$ 。

（3）如果待测样品 Ct 值位于 38-40 之间，建议重复测定 1 次，如重复测定 Ct 值 < 40 ，且有明显的扩增曲线，则判定为阳性。

上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

修订日期：2025 年 09 月 25 日

生效日期：2025 年 10 月 09 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189