

## 人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)

产品编号	产品名称	包装
D8021S	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)	50次
D8021M	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)	200次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法) (Human Telomerase Activity Assay Kit by Probe qPCR for TERT mRNA), 又称qPCR双荧光探针法人端粒酶催化亚基hTERT检测试剂盒(Human Telomerase Reverse Transcriptase Subunit Assay Kit by qPCR with Dual Fluorescent Probes), 或hTERT qPCR检测试剂盒(hTERT qPCR Assay Kit), 是一种基于端粒酶催化亚基TERT基因和内参基因GAPDH的双荧光探针, 快速、灵敏地检测人细胞或组织内端粒酶催化亚基(hTERT)表达量从而间接衡量端粒酶活性的试剂盒。本试剂盒为防污染型qPCR检测试剂盒, 含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性或CT值偏低。
- 端粒酶(Telomerase)是一种由蛋白质和RNA组成的特殊逆转录酶, 与真核细胞染色体末端端粒的合成直接相关。正常体细胞端粒的长度随着细胞的分裂逐渐缩短, 而端粒酶活性增强则可以有效维持端粒的长度。异常的端粒酶活性升高会导致细胞异常增殖而发生癌变。除了正常的人类白细胞(如活化的B淋巴细胞和T淋巴细胞)、人类生殖系组织(成年睾丸和卵巢, 但不包括成熟精子和卵母细胞)和增殖干细胞外, 通常在正常体细胞中检测不到端粒酶活性, 但是多数人类癌症以及一些癌前病变和良性肿瘤中可以检测到端粒酶活性异常增高, 因此高灵敏快速检测端粒酶活性在癌症的早期诊断中具有重要意义[1]。人端粒酶主要由三部分组成, 包括端粒酶逆转录酶(Human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、人端粒酶RNA (Human telomerase RNA, hTER or hTR)以及端粒酶相关蛋白(Human telomerase associated proteins) [2]。其中hTERT被认为是端粒酶活性的关键组分, 编码hTERT的mRNA水平与端粒酶整体活性基本一致, 因此可以用hTERT的mRNA水平来衡量端粒酶活性[3]。
- 目前, 检测端粒酶活性最常用的方法分为直接检测法和间接检测法。直接检测法主要检测端粒酶是否可以延伸DNA模板, 通过核酸电泳或者探针杂交检测DNA延伸的长度, 以此判断端粒酶的活性高低, 如端粒重复序列扩增法(Telomerase repeat amplification protocol, TRAP)、端粒重复序列延伸法、比色法、荧光法、表面增强拉曼光谱法等, 这些方法需要提取蛋白, 操作较复杂, 灵敏度不高; 或需要放射性同位素标记, 对于操作环境要求高, 不安全; 或重复性差、周期长。而间接检测法主要检测端粒酶催化亚基hTERT的mRNA水平来间接反映端粒酶的活性。该方法操作相对简便, 只需抽提mRNA、反转录成cDNA、荧光定量PCR这三个步骤即可完成, 具有较高的灵敏度高和准确性。本试剂盒采用的是间接检测法。
- 本试剂盒以端粒酶的TERT基因和内参GAPDH基因的mRNA作为检测靶点, 提供了优化的引物和探针。每条检测探针的5'端标记FAM或Cy3荧光基团, 3'端标记BHQ1或BHQ2淬灭基团。扩增之前探针上的淬灭基团由于空间上的荧光共振能力转移(FRET)而导致荧光基团淬灭。PCR反应时, 引物和探针都会退火到目标基因上, 随着引物的延伸, Taq酶的5'→3'外切酶活性会导致结合在目标基因上的探针从5'端开始逐渐被降解。探针的荧光基团和淬灭基团被Taq酶切开后, 淬灭基团的作用消失, 荧光基团就能正常地被激发光所激发而产生荧光。每经过一个PCR循环, 就会有更多的荧光基团被释放, 荧光强度与新合成的目标片段数量成正比, 荧光定量PCR可根据检测到的荧光信号绘制出实时扩增曲线, 从而实现对人端粒酶催化亚基(hTERT)表达量的检测。
- 本试剂盒提供了RNA反转录实验所需的特异性引物(Specific RT Primers)、qPCR实验所需的预混液(BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)和特异性引物探针混合物(Primer/Probe Mix)。BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)包含了BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、稳定剂和镁离子等所有的通用组分。此外, 本试剂盒提供Positive Control, 即阳性对照, 用于检测试剂盒本身是否能正常工作。

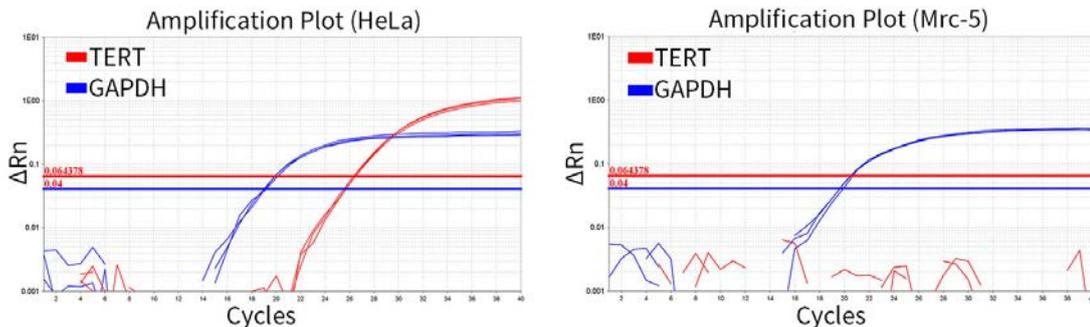


图1. 碧云天人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法) (D8021)用于阳性样品和阴性样品的检测效果图。左图是阳性样品HeLa细胞cDNA的检测效果图, TERT的Ct值可以被检测到(约26~27), 表现出一定的端粒酶活性; 右图是阴性样品Mrc-5细胞cDNA的检测效果图, 几乎检测不出TERT的Ct值, 即无端粒酶活性。FAM为TERT检测信号, Cy3为内参GAPDH检测信号。实测

数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- UDG (Uracil-DNA Glycosylase), 也称UNG (Uracil-N-glycosylase), 可催化含尿嘧啶的DNA链中的尿嘧啶(dU)碱基和脱氧核糖之间的N-糖苷键发生水解, 从而释放游离尿嘧啶, 主要应用于消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题。其防止污染的原理为: 在PCR反应中加入适量的dUTP, 以dUTP替代dTTP掺入DNA中, 形成含dU碱基的PCR扩增产物; 后续进行PCR反应时, 使用UDG酶选择性切割可能被污染而带入的之前PCR扩增产生的含有dU的单链或双链DNA, 从而避免之前的PCR扩增产物可能的污染对于本次PCR扩增带来的负面影响。
- 本试剂盒提供了Low ROX和High ROX, 广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动, 从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起, 如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同, 请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX。常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500 (Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT (Fast); ABI StepOne (Plus)

- 本试剂盒如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl)或384孔板qPCR检测(建议反应体系为10μl), 本产品小包装分别可以进行50次和100次检测, 中包装分别可进行200次和400次检测。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D8021S-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	500μl
D8021S-2	Specific RT Primers (10X)	100μl
D8021S-3	Primer/Probe Mix (10X)	100μl
D8021S-4	Positive Control (10X)	10μl
D8021S-5	Low ROX (50X)	20μl
D8021S-6	High ROX (50X)	20μl
D8021S-7	Ultrapure Water	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D8021M-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	2ml
D8021M-2	Specific RT Primers (10X)	400μl
D8021M-3	Primer/Probe Mix (10X)	400μl
D8021M-4	Positive Control (10X)	20μl
D8021M-5	Low ROX (50X)	80μl
D8021M-6	High ROX (50X)	80μl
D8021M-7	Ultrapure Water	2ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中Primer/Probe Mix (10X)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)须避光保存, 并尽量避免反复冻融。

#### 注意事项:

- 使用前需确保试剂完全融化, 上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- Primer/Probe Mix (10X)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)中含有荧光染料, 保存本产品或设置PCR反应时应避免强光照射, 以尽量避免荧光淬灭问题。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测, 请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。虽然本产品为防污染型, 但仍建议勿在PCR反应设置区域撕开PCR封板膜或打开PCR管盖, PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理, 以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。

- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系，这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™ 无菌滤芯盒装吸头 (FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明：

### 1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂。

- 具有FAM和Cy3荧光通道的荧光定量PCR仪。
- DNase-free、RNase-free的吸头、离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜等。

### 2. 总RNA抽提与反转录。

- 提取细胞或组织样品的总RNA。

使用离心柱法提取细胞或组织样本RNA，推荐使用RNAeasy™ 动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0026)；使用常见的苯酚-异硫氰酸胍法，推荐使用Beyozol (总RNA抽提试剂) (R0011)。提取后推荐使用DNase I处理，以去除RNA样品中可能的基因组DNA污染，推荐使用DNase I (D7073)。提取获得的RNA样品，其A260/280通常应在1.9-2.0之间。

- RNA反转录。

推荐使用BeyoRT™ Q cDNA第一链合成试剂盒(D7190)或BeyoRT™ Q M-MLV反转录酶(D7188)，取1μg总RNA进行反转录反应。

- 参考下表设置反转录反应：

Reagent	Volume
Total RNA	1μg
Specific RT Primers (10X)	2μl
Ultrapure Water	To 12μl
65°C 孵育5分钟，随后立即置于冰上冷却	
Reaction Buffer (5X)	4μl
RNase Inhibitor (20U/μl)	1μl
dNTP Mix (10mM each)	2μl
BeyoRT™ Q M-MLV反转录酶	1μl
总体积	20μl

- 轻轻混匀(用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。

- 在PCR仪中反应，程序设置为25°C 10分钟；42°C 10分钟；80°C 10分钟。

- 反转录产物可以直接用于后续的qPCR反应，也可以-20°C冻存以备以后使用。

### 3. qPCR反应体系的设置。

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。

- 参考下表在室温或冰浴上设置qPCR反应体系(以96孔板，每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、阴性对照(Negative Control)或阳性对照(Positive Control)。Positive Control (10X)需稀释10倍后使用，例如1微升Positive Control (10X)加入9微升Ultrapure Water配制成10微升Positive Control (1X)。Negative Control可使用Ultrapure Water。建议每次检测都设置Negative Control和Positive Control (1X)。

注：Positive Control稀释后反复冻融容易降解，建议现配现用。

Reagent	Volume
BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	10μl
Primer/Probe Mix (10X)	2μl
Template	2μl
Without or Low/High ROX (50X)	0 or 0.4μl
Ultrapure Water	To 20μl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。推荐BeyoFuge™ 掌上离心机(5000rpm)或BeyoFuge™ 基础型微孔板离心机(垂直式，2500rpm)进行PCR管或板的短暂离心。

- 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。

- 荧光检测通道的选择：TERT基因荧光基团是FAM，可选择检测通道(Reporter)为FAM，淬灭基团(Quencher)是BHQ1，如果没有BHQ1，则选择无；内参GAPDH基因荧光基团是Cy3，可选择检测通道为Cy3，淬灭基团是BHQ2，如果没有BHQ2，则选择无。

### 4. qPCR反应程序：

本试剂盒建议采用如下的qPCR程序，本程序是以QuantStudio™ 6 Flex Systems荧光定量PCR仪为例：

- UDG酶处理：50°C 5分钟；
- 预变性：95°C 5分钟；
- 变性：95°C 15秒；
- 退火/延伸：60°C 15秒；

- e. 重复步骤c和步骤d, 总共40个循环;  
f. 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果。

#### 5. 结果的定性判断和相对定量:

- a. 阳性对照: TERT基因(FAM通道) Ct值在 $25 \pm 3$ 左右, 内参GAPDH基因(Cy3通道) Ct值在 $18 \pm 3$ 左右。如果两者中的任意一个Ct值大于该范围, 说明阳性对照有降解, 需要减少稀释比例。  
b. 阴性对照(Ultrapur Water): TERT基因(FAM通道)无典型S型扩增曲线或Ct值 $\geq 35$ , 内参GAPDH基因(Cy3通道)无典型S型扩增曲线或Ct值 $\geq 35$ 。  
c. 样品阴性: 如果待测样本检测结果TERT基因(FAM通道)无典型S型扩增曲线或Ct值 $\geq 35$ , 内参GAPDH基因(Cy3通道) Ct值在 $18 \pm 3$ 左右, 且阳性对照品检测结果为阳性, 阴性对照品检测结果为阴性, 此次结果判断为端粒酶活性阴性。  
d. 如果样品不是阴性, 此时不同样品之间可以通过Ct值进行相对定量, 以比较不同样品之间的TERT mRNA水平的变化, 用于判定端粒酶活性水平的高低。

#### 参考文献:

1. Chen X, Deng Y, Cao G, Liu X, Gu T, et al. Anal Chim Acta. 2021. 1146:61-69.
2. Liu B, He Y, Wang Y, Song H, Zhou ZH, Feigon J. Nature. 2022. 604(7906):578-583.
3. Oshita T, Nagai N, Ohama K. Int J Oncol. 2000. 17(6):1225-30.

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
R0024	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次
R0026	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0027	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
D7073/D7076	DNase I	200U/1000U
D7190	BeyoRT™ Q cDNA第一链合成试剂盒	20次/100次/500次
D8018	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA染料法)	50次/200次
D8021	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)	50次/200次
D7580	猫细小病毒(FPV)染料法qPCR检测试剂盒	50次/200次
D7583	猫细小病毒(FPV)探针法qPCR检测试剂盒	50次/200次
D8006	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次/500次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20片/100片
FSF039	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/100片
FTUB325	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
FTUB326	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明, 6条/袋)	50袋/250袋
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB335	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装

Version 2024.11.07