

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:111009-50  
低温运输,-20℃保存

**TIANDZ**

**端粒酶重复片段扩增试剂盒**  
**TRAP Kit**

**使用手册 V1.3**

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>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。本产品专门用于快速测定人类细胞端粒酶活性。它具有以下特征：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 一站式，提供从细胞裂解到 PCR 的所有试剂，但不含 PAGE 和银染试剂。</li> <li>2. 一管式操作，端粒酶延伸和 PCR 在同一体系中完成，方便快捷。</li> <li>3. 提供改进的、长为 150 bp 的内参和含 8 个端粒序列的合成端粒，可有效排除 PCR 假阴性。内参长度远大于 TRAP 产物，不会干扰结果分析。</li> <li>4. 改良的 TS 模板和 PCR 引物，极大降低了引物二聚体的形成。</li> <li>5. 既可用于培养细胞，也可用于实体组织。</li> <li>6. 灵敏度高，最低可以检测到 10 个肿瘤细胞中的端粒酶活性。</li> </ol>																								
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>50 次小纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAP 细胞裂解液</td> <td>111009A</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>PCR Mix 3.0</td> <td>90805</td> <td>1.5 mL</td> </tr> <tr> <td>合成端粒(PC)</td> <td>yw747</td> <td>50 uL</td> </tr> <tr> <td>TS-引物混合物 (含内参)</td> <td>yw741742</td> <td>300 uL</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>111009sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成 份	编 号	50 次小纸盒包装	TRAP 细胞裂解液	111009A	10 mL	PCR Mix 3.0	90805	1.5 mL	合成端粒(PC)	yw747	50 uL	TS-引物混合物 (含内参)	yw741742	300 uL	超纯水	100935	1 mL	使用手册	111009sc	1 份
成 份	编 号	50 次小纸盒包装																							
TRAP 细胞裂解液	111009A	10 mL																							
PCR Mix 3.0	90805	1.5 mL																							
合成端粒(PC)	yw747	50 uL																							
TS-引物混合物 (含内参)	yw741742	300 uL																							
超纯水	100935	1 mL																							
使用手册	111009sc	1 份																							
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																								
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>PAGE 电泳及银染试剂盒</p>																								
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一：端粒酶的提取</b></p> <p>注意：端粒酶的组成成分中有 RNA，极易被降解，因此，应该跟提取 RNA 一样，尽量在低温条件下快速操作、最好使用固相 RNase 清除剂 (CAT#:3090) 清洁试验台。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 对冷冻的实体组织:将 50-100 mg 冷冻组织在液氮中用预冷的研磨器研磨成粉末，再转移到预冷的玻璃匀浆器中，加入 200 uL 预冷的 TRAP 细胞裂解液，温和手动匀浆数次后冰浴 30 分钟，每间隔数分钟涡旋振荡一次，共 5-6 次，然后直接进入第 3 步操作。为保证裂解效果，可在显微镜下观察。如果组织样品不足 50-100 mg，可以按比例降低 TRAP 细胞裂解液的用量。</li> <li>2. 对新鲜的培养细胞和组织：用自备的预冷 PBS 洗涤 <math>10^5</math>-<math>10^6</math> 个经过胰酶处理的细</li> </ol>																								



超纯水	17 uL					
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------

注：为避免污染，最好等其他样品加完并盖上 PCR 管盖后再加阳性对照（合成端粒）。

7. 吹打混匀后进行 PCR 扩增，扩增条件（仅供参考，用户可优化）如下：

步骤	温度	时间
端粒酶延伸	30℃	30 分钟
端粒酶灭活	95℃	5 分钟
PCR (循环 35 次)	94℃	30 秒
	55℃	60 秒
	72℃	30 秒

三：PAGE-银染检测及结果解读（本试剂盒不含 PAGE-银染检测试剂盒）

8. 取 5uL PCR 反应液进行 10%非变性 PAGE 电泳-银染显色实验（需另购试剂盒）。

如果背景高（主要是由反应体系中的蛋白成分引起），可以 PCR 产物纯化再进行 PAGE 电泳和银染。

9. 跟预期结果（见下表）比较。如果结果跟下表不一致，则需要按具体情况分析原因。

成份	样品管结果	样品阴性对照	实验阴性对照结果	实验阳性对照结果
典型 TRAP 条带（条带数不限）	有则有端粒酶活性 无则无端粒酶活性	不出现	不出现	不出现
阳性对照的 TRAP 条带（仅 8 条带）	不出现	不出现	不出现	出现
150bp 内参	可出现可不出现	出现	出现	出现

注：本试剂盒所用引物产生的典型 TRAP 条带最小条带为 59bp。当样品端粒活性太强，其端粒产物在扩增时会与 150bp 内参竞争引物，故可能不会出现 150bp 条带。

### 疑难解答

1. 如果样品管有内参带，但没有 TRAP 条带，可能是端粒酶活性低或者失活。制备细胞裂解物时可在 TRAP 细胞裂解液中加入 1/100 体积的 RNase 抑制剂以抑制 RNase 活性，并在端粒延伸反应后增加 DNA 纯化一步，纯化后的 DNA 再用于 PCR（两步法）。
2. 如果样品对照管（端粒酶已经灭活）出现 TRAP 条带，可能是 TRAP 产物污染，也可能是端粒酶没有彻底灭活，建议用 RNase 酶解法或酶解+热灭活法。
3. NC 中出现条带，可能是引物二聚体，可采取两步法 TRAP，并且在将 DNA 模板加入到 70℃保温状态中的 PCR Mix3.0 中再进行 PCR。

### 关联产品

荧光定量 TRAP 试剂盒