

CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN29-100

版本：05 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

【产品名称】
CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】
100 Reactions/盒

【预期用途】
用于定量检测来源于 HIV-1 型慢病毒载体技术制备的人源细胞产品中目的基因的拷贝数，如 CAR-T 或 TCR-T 细胞基因组中 CAR 或 TCR 基因的拷贝数。

【产品简介】
本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对转移质粒上与整合或表达功能相关的 DNA 序列和人体细胞中单拷贝基因（Single Copy Gene，SCG）设计引物探针，项目采用数字 PCR 技术定值后稀释制备的即用型校准品，能够检测样品中平均每个细胞的目的基因拷贝数，如 CAR 或 TCR 基因拷贝数水平。试剂盒含有内标，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒配套使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格（100 Reactions/盒）
CAR/TCR qPCR MIX	1.0mL×2 管
CAR/TCR 内标*	1.0mL×1 管
CAR/TCR 阴性对照	1.0mL×2 管
CAR/TCR 校准品 ST1	0.5mL×1 管（1×10 ¹ copies/μL）
CAR/TCR 校准品 ST2	0.5mL×1 管（1×10 ² copies/μL）
CAR/TCR 校准品 ST3	0.5mL×1 管（1×10 ³ copies/μL）
CAR/TCR 校准品 ST4	0.5mL×1 管（1×10 ⁴ copies/μL）
CAR/TCR 校准品 ST5	0.5mL×1 管（1×10 ⁵ copies/μL）
CAR/TCR 校准品 ST6	0.5mL×1 管（1×10 ⁶ copies/μL）

说明：
不同批号试剂盒中各组分不可以混用。
实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。
*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时可以不设置 CY5 通道，结果分析时无需关注 CY5 结果。
*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1μL 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 41μL/反应。

【储存条件及有效期】
1、置于≤-20℃下避光保存，有效期 24 个月。
2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。
3、产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】
包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【检验方法】
从试剂盒中取出 CAR/TCR qPCR MIX、CAR/TCR 内标、CAR/TCR 阴性对照、CAR/TCR 校准品 ST1~ST6，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1. 加样回收质控 ERC 制备
根据需要设置 ERC 中的 CAR/TCR 加样浓度（以制备加 1×10⁶copies 的 ERC 为例），具体操作如下：

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。
- 2) 加入 10 μ L CAR/TCR 校准品 ST5 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

2. 反应液准备

2.1 根据待测标本数，计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样。

PCR 反应液数= (6 个浓度梯度的校准品+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS+待测样本+待测样本 ERC) $\times$ 3。然后将相应数量的 qPCR MIX，按照一孔 20 μ L 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

2.2 各反应孔加样示例：

组分	加样量
标准曲线	20 μ L CAR/TCR qPCR MIX + 20 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μ L CAR/TCR qPCR MIX + 20 μ L 阴性对照
NCS	20 μ L CAR/TCR qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
待测样本	20 μ L CAR/TCR qPCR MIX + 20 μ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μ L CAR/TCR qPCR MIX + 20 μ L 样本 ERC 纯化液

3. 样本核酸提取

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100 μ L，内标添加量为 10 μ L。

4. 荧光 PCR 反应

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 CAR/TCR qPCR MIX 中，盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50 $^{\circ}$ C：2 分钟	1
预变性	95 $^{\circ}$ C：3 分钟	1
PCR 扩增	95 $^{\circ}$ C：10 秒，60 $^{\circ}$ C（采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX、CY5，其中 FAM 为 CAR/TCR 基因，ROX 为 SCG 基因，CY5 为内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 none。

5. 结果判定

5.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。

5.2 内标的判读

正常情况下，样本内标的 Ct 值与 NCS 内标的 Ct 值相差在 1.5Ct 内；对于强阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致强阳性结果内标不出值或者出值较差。

5.3 试验成立条件

NTC，NCS 的 FAM 及 ROX 通道无 Ct 值或大于标曲最低浓度点的 Ct 值；标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$ 。

6. 结果分析

6.1 以 SLAN-96P 为例：

- 1) 若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到超过本底信号波动位置；
- 2) 在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏分别赋值为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 （单位为 copies/ μ L），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1；
- 3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。
- 4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/ μ L。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150%之间。

6.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例：

- 1) 若需要调整阈值线, 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中, 将 FAM 通道、ROX 通道 Threshold 设置到超过本底信号波动位置, 点击 Analyze;
- 2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别赋值为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 (单位为 copies/ μ L), 并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC;
- 3) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、 R^2 等;
- 4) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中, Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值, 单位为 copies/ μ L。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率, 加样回收率要求在 50%-150%之间。

7. 结果计算

CAR 或 TCR copies/cell = $2 \times$ CAR 或 TCR/SCG。

【注意事项】

- 1、试剂盒应在 -20°C 以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书, 严格按照操作步骤执行, 在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase, 提取过程尽量快速, 完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化, 瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融, 以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖, 避免徒手或使用过的手套接触反应管, 检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理, 依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖, 避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖, 实验产生的废弃物应及时收集, 远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本为强阳性时, 由于体系的竞争抑制, 可能会对内标检测造成影响。
- 11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【免责声明】

在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱: marketing@biori.com.cn

网址: www.biori.com

