CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒（多重 qPCR- 荧光探针法）说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-CA001

产品简介

CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒是用于定量检测来源于 HIV-1 型慢病毒载体技术制备的 CAR-T/TCR-T/CAR-NK 细胞基因组中 CAR 基因拷贝数检测的专用试剂盒。

配套我司血液 / 组织 / 细胞基因组 DNA 提取试剂盒（货号为 HG-NA100）进行样品的前处理。

检测范围：3×10^{1} copies/μL~3×10^{6} copies/μL

规格

100 Reactions

产品组成

表 1 试剂盒组分

组 分	规格	存储条件
CAR 定量参考品（3×10^{8} copies/μL）	50μL×1 管	-20°C
CAR Primer&Probe Mix	550μL×1 管	
2× qPCR Reaction Buffer	1.2mL×1 管	
DNA 稀释液	1.5mL×3 管	
ROX High	50μL×1 管	
ROX Low	50μL×1 管	

储存条件与有效期

存储条件见上表，有效期 18 个月。

适用机型

包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

表 2 不同仪器适配的参比染料 ROX

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700，7000，7300，7700，7900HT，StepOne™，and StepOnePlusT™	ROX High
Applied Biosystems® 7500，ViiATM 7，QuantStudio™12K Flex，Agilent Mx3000P™，Mx3005P™，and Mx4000™	ROX Low
Rotor-Gene™，DNA Engine Opticon™，Opticon™2，Chromo 4™ Real-Time Detector，Mastercycler® ep realplex，Smart Cycler®，Roche LightCycle®480，Roche LightCycler®Nano，Bio-Rad CFX96，and IIlumina Eco™	No ROX

备注：请对应机型选择适配的 ROX。如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

需要准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5mL 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μL，200μL，10μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 水浴锅 / 金属浴
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μL，200μL，10μL，2.5μL 等）
- 磁力架

实验步骤

一、 样品前处理

详见我司血液 / 组织 / 细胞基因组 DNA 提取试剂盒（货号为 HG-NA100）操作说明书。

二、 qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC/NCS 的制备

1.1 定量参考品：取出 CAR 定量参考品、DNA 稀释液置于冰上融化；待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心；

1.2 取 7 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6；

1.3 标准品稀释过程如下表

表 3. 标准品稀释过程

标准品代号	稀释体积	浓度（copies/μL）
ST0	10μL 定量参考品 + 90μL DNA 稀释液	3×10^7
ST1	10μL ST0 + 90μL DNA 稀释液	3×10^6
ST2	10μL ST1 + 90μL DNA 稀释液	3×10^5
ST3	10μL ST2 + 90μL DNA 稀释液	3×10^4
ST4	10μL ST3 + 90μL DNA 稀释液	3×10^3
ST5	10μL ST4 + 90μL DNA 稀释液	3×10^2
ST6	10μL ST5 + 90μL DNA 稀释液	3×10^1

1.4 NTC 的制备：100uL DNA 稀释液；

1.5 NCS 的制备 : 随样品取 100μL DNA 稀释液进行样品预处理。

2. q-PCR 反应液的制备和加样

2.1 根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 个复孔），计算所需孔数：

反应孔数 =（6 个浓度梯度的标曲 +2 个阴性对照 NTC 和 NCS + 待测样品）×3

2.2 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量：

qPCR Mix =（反应孔数 +2 或 3）× 15μL（2 或 3 为操作损失量）

2.3 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 4 所示配制 qPCR Mix。

表 4.　qPCR Mix 配制表

组分	单个反应量 (μL)
2× qPCR Reaction Buffer	10
CAR Primer&Probe Mix	4.6
ROX*	0.4
总体积	15

备注：请对应机型选择适配的 ROX；若机型适配为 no ROX，请加入等体积的去离子水（要求无核酸及核酸酶污染）。

3. 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 5 所示加样（总体积 20μL）

表 5. 各反应孔加样示例

参考品	15μL qPCR Mix +5μL ST1/2/3/4/5/6
阴性对照	15μL qPCR Mix +5μL NTC/NCS
待测样品	15μL qPCR Mix +5μL 待测样本

4. 实验需使用 qPCR 实验专用的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心将液体离至管底准备反应。

5. 反应孔排版示例

表 6.　96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1							S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2							S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3							S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5									
F	ST6	ST6	ST6									
G					NTC	NTC	NTC					
H					NCS	NCS	NCS					

三、 qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1. 创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表

表 7.　PCR 反应程序

Stage1	预变性	Reps:1	95°C	10min
Stage2	循环反应	Reps:40	95°C	15s
			60°C	60s

备注：反应体积 20μL。程序中 60°C 60s 处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

2. 创建实验反应板，点击 Select Fluorophores 选择荧光 FAM 和 Cy5;

在反应板图表中，选择样品孔，在 SampleType 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 CAR；勾选荧光 Cy5，Target Name 命名为 RFG，输入每个样品的重复次数及 Sample Name。

在反应板图表中，选择标曲孔，在 SampleType 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 CAR；勾选荧光 Cy5，Target Name 命名为 RFG，输入每个稀释梯度的重复次数及 SampleName。并且分别在 ST1， ST2， ST3，ST4，ST5，ST6 的 Concentration 一栏赋值为 3E+06、3E+05、3E+04、3E+03、3E+02、3E+01(单位为 copies/uL) 。

3. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

四、 qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例

1. 点击资料分析视窗 Quantitation，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、扩增效率（Effect）、R^2。

2. 在视窗 Quantitation Data 中，SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 copies/μL。

3. 数据可靠性评估：

- 三个平行孔间 Ct 值差应小于 1.0，Ct 值大于 35 的孔除外；
- 阴性对照 NTC 和 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值或根据实验室自身验证结果设定标准；
- 标准曲线线性相关系数 $R^2 \geqslant 0.98$，扩增效率 85%~110% 之间；

4. 结果计算：CAR 拷贝数 / 细胞 = 2 x CAR / RFG

注意事项

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。

2. 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。

3. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。

5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。

6. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。

7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。

8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。

9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。

10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

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。

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.6.2406
江苏谱新生物医药有限公司
A. 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼
T.400 900 1882 W.www.hillgene.com