

RCL(VSVG)基因拷贝数检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法) 说明书

【产品简介】

RCL(VSVG)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 细胞基因组中 RCL 基因拷贝数检测的专用试剂盒。

本试剂盒基于荧光探针法, 采用多重 PCR 法检测转移质粒上与整合或表达功能相关的 DNA 序列, 计算得到样本中 VSVG 基因拷贝数, 本试剂盒检测快速, 专一性强, 性能可靠。

【规格】

100 Reactions

【储存条件】

-20°C以下储存, 有效期 18 个月。

【试剂盒组成】

表 1 试剂盒组分

组分	规格	储存条件
RCL 定量参考品	50 μ l \times 1 管	-20°C及以下
RCL Primer&Probe MIX	550 μ l \times 1 管	-20°C及以下, 避光
2x qPCR Reaction Buffer	1.1ml \times 1 管	-20°C及以下, 避光
DNA 稀释液	1ml \times 3 管	-20°C及以下
ROX High*	50 μ l \times 1 管	-20°C及以下, 避光
ROX Low*	50 μ l \times 1 管	-20°C及以下, 避光

*请对应机型选择适配的 ROX。

通用机型（包括但不限于）

- ◆ ABI PRISM 7500
- ◆ CFX96 (Bio-Rad)
- ◆ Linegene 9600plus（博日）

配合不同机型使用时，请注意选择适配的参比染料 ROX。

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, and StepOnePlus™	ROX High
Applied Biosystems® 7500, ViiA™ 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 Illumina Eco™	No ROX

用户自备材料

- ◆ 1.5ml 低吸附无菌离心管
- ◆ qPCR 反应板或条

【操作步骤】

一、RCL 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

RCL 定量参考品浓度标注于管壁标签，请确认后再进行稀释。通过以下公式来换算拷贝数：

$$\text{质粒拷贝数 (copies/}\mu\text{l)} = 6.02 \times 10^{14} \times \text{质粒浓度 (ng/}\mu\text{l)} / (\text{质粒碱基数} \times 660)$$

得到：RCL 基因拷贝数为 2.00×10^7 copies/ μl

二、RCL 定量参考品 10 倍梯度稀释，具体操作如下：

1. 取出 RCL 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。
2. 取 6 支干净的 1.5ml 离心管，分别标记 STD0，STD1，STD2，STD3，STD4，STD5。

标准品稀释过程如下表：

标准品代号	稀释体积	浓度 (copies/ μ l)
STD0	5 μ l 标准品+95 μ l DNA 稀释液	1.00×10^6
STD1	10 μ l STD0+90 μ l DNA 稀释液	1.00×10^5
STD2	10 μ l STD1+90 μ l DNA 稀释液	1.00×10^4
STD3	10 μ l STD2+90 μ l DNA 稀释液	1.00×10^3
STD4	10 μ l STD3+90 μ l DNA 稀释液	1.00×10^2
STD5	10 μ l STD4+90 μ l DNA 稀释液	1.00×10^1

三、qPCR 反应液的制备和加样

1. 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数 = (5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+待测样本数) \times 3

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) \times 15 μ l (含有 2 孔的损失量)

3. 取出各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按下表所示加样配制 qPCR MIX：

组分	单孔反应
2x qPCR Reaction Buffer	10 μ l
RCL Primer&Probe MIX	4.6 μ l
ROX*	0.4 μ l
总体积	15 μ l

*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级去离子水）。

各反应孔加样如下表：

标准曲线	15 μ l qPCR MIX +5 μ lSTD1/STD2/STD3/STD4/STD5
无模板对照 NTC	15 μ l qPCR MIX +5 μ l DNA 稀释液
待测样本	15 μ l qPCR MIX +5 μ l 待测样本

加样完成后每孔总体积为 20 μ l，将 96 孔板轻微振荡混匀，短时间快速离心 10s 后放入 qPCR 仪。

四、qPCR 程序参数设置

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：PCR 反应程序如下：95 $^{\circ}$ C 预变性 2min；95 $^{\circ}$ C 15s，60 $^{\circ}$ C 15s，45 个循环，反应体积 20 μ l。

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

在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 RCL；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 Sample Type 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 RCL；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。并且分别在 STD1，STD2，STD3，STD4，STD5 的 Concentration 一栏赋值为 100000、10000、1000、100、10（单位为 copies/ μ l）。

3.点击 Start Run，选择保存路径。

五、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、待测样本的 RCL 检测值，单位为 copies/ μ l。

3.无模板对照 NTC 检测结果应为 N/A 或 Ct 值大于标准曲线最低浓度 Ct 均值。

4.RCL 阴性判定标准：样本 3 个平行孔均无 Ct 值或样本 3 个平行孔有 2 个孔无 Ct 值和 1 个孔有 Ct 值且检出孔的 Ct 值大于 LLOQ 的 Ct 值。

5.RCL 阳性判定标准：样本 2 个或以上孔检出 VSV-G 基因拷贝数不低于 10copies/反应，判定为 VSV-G 基因阳性。



xinbio

苏州欣协生物科技有限公司

电话：0512-63037851

网址：www.xinbiotech.cn

邮箱：info@szxxbio.com