

CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒（多重 qPCR-荧光探针法）

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 细胞基因组中 CAR 基因拷贝数检测的专用试剂盒。

检测范围： 3×10^1 copies/ μL - 3×10^6 copies/ μL

货号

91-25-0011

规格

100 Reactions

产品组成

表 1 试剂盒组分

组分	规格
CAR定量参考品 (3×10^8 copies/ μL)	50 μL × 1 管
CAR Primer&Probe Mix	550 μL × 1 管
2×qPCR Reaction Buffer	1.2 mL × 1 管
DNA稀释液	1.5 mL × 3 管
ROX High	50 μL × 1 管
ROX Low	50 μL × 1 管

储存条件

-20℃ 储存，有效期 18 个月。

适用机型

包括但不限于 ABI 7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时荧光定量 PCR

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

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 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

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询我司或仪器厂家。

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

实验步骤

一、样品前处理

二、qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC 的制备

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

1.2 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，轻微震荡混匀，瞬时离心；

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

1.4 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 (fg/ μL)
ST0	10 μL 定量参考品+90 μL DNA 稀释液	3×10^7
ST1	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	3×10^6
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA 稀释液	3×10^5
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	3×10^4
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	3×10^3
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	3×10^2
ST6	10 μL ST5+90 μL DNA 稀释液	3×10^1

1.5 NTC 的制备：100 μL DNA 稀释液；

2. qPCR 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+1 个阴性对照 NTC+待测样品) $\times 3$

2.2 根据反应孔数计算本次所需的质粒 qPCR Mix 总量：

qPCR Mix= (反应孔数+2 或 3) ×15 μL (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 20 μL）

表 5 各反应孔加样示例

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

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

G					NTC	NTC	NTC					
H					NCS	NCS	NCS					

三、qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司的 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℃	2 min
Stage2	循环反应	Reps: 40	95℃	15s
			60℃	60s

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

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 RFG;输入每个样品的重复次数及 Sample Name;

3. 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 RFG；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 的 concentration 一栏赋值为 3.00E+06、3.00E+05、3.00E+04、3.00E+03、3.00E+02、3.00E+01（单位为 copies/ μ L）；

4. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

四、qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司的 CFX96 PCR 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、待测样本的检测值，单位为

copies/ μ L。

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；
- 无模板对照 NTC 应无 Ct 值或大于标准曲线最低浓度 2 个 Ct 值以上；
- 阴性对照 NCS 应无 Ct 值或大于标准曲线最低浓度的 Ct 值；
- 标准曲线线性相关系数 $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率 85%-110%之间。

4. 结果计算：CAR 拷贝数/细胞 = $2 \times \text{CAR} / \text{RFG}$

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. 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。

xin3io