

CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒
(多重 PCR-荧光探针法)
说明书

货号：SK030221CA100

版本：A/3

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒适用于定量检测来源于常见的 **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** 和 **TCR-T** 细胞基因组中 CAR 或 TCR 基因的拷贝数。

本试剂盒基于荧光探针法, 采用多重 qPCR 的方法分别检测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) 的方法, 计算得到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。本试剂盒检测快速, 专一性强, 性能可靠, 针对慢病毒载体技术具有通用性。试剂盒配套有本公司构建的定量参考品。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
CAR/TCR 定量参考品	NNA022	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
CAR/TCR Primer & Probe MIX	NNC032	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
IPC MIX	NNC066	150 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型 (包括但不限于)

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600plus 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 低吸附无菌离心管
- qPCR 反应板或条
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌有滤芯低吸附枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程

❖ CAR/TCR 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

CAR/TCR 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: CAR/TCR 和 SCG 基因拷贝数均为 2.33×10^8 copies / μL

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 CAR/TCR 定量参考品进行 10 倍梯度稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中的定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下融化, 待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 s, 如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将定量参考品稀释 10 倍, 得到 ST0, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s, 重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. CAR/TCR 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies / μL)	
		CAR/TCR	SCG
ST1	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	2.33×10^6	2.33×10^6
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA 稀释液	2.33×10^5	2.33×10^5
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	2.33×10^4	2.33×10^4
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	2.33×10^3	2.33×10^3
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	2.33×10^2	2.33×10^2

 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。

 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行孵育。

❖ 阴性质控 NCS 的制备

1. 建议随行阴性质控样品 NCS (DNA 稀释液) 同样品一起进行前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ qPCR 反应液的制备

2. 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量, 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+1 个阴性质控样品 NCS+待测样品数) × 3

3. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量 (含有 2 孔的损失量):

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L}$$

4. 各试剂置于冰上或 2-8 °C 条件下融化, 轻微振荡混匀, 按表 3 所示加样:

表 3. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
CAR/TCR Primer & Probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

❖ 加样

1. 上述各试剂置于冰上, 轻微震荡混匀, 按表 4 所示加样:

表 4. 各反应孔加样示例

标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	20 μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX + 10 μL NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX + 10 μL 待测样品纯化液

加样完成后每孔总体积为 30 μL。

表 5.96 孔板排版示例

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

该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的标准曲线 (ST1-ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控样品 NCS、3 个待测样品 (S1-S3)。每个检测做 3 个重复孔。

实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。待测样品的每孔上样总量推荐 5 ng-30 ng 区间, 可根据预实验情况适当调整。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

❖ qPCR 程序设置

◇ SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
3. 选择步骤 2: 选择项目中的“CAR-TCR 拷贝数检测”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ 其他定量 PCR 系统程序设置如下:

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针, 命名为 CAR 或 TCR, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 创建新检测探针, 命名为 SCG, 选择报告荧光基团为 CY5, 猝灭荧光基团为 none; 创建新检测探针, 命名为 IPC, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none; 检测参比荧光为 ROX (可选)。

3. 设置两步法反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (读取荧光),

40 个循环; 反应体积 30 μL 。

❖ qPCR 结果分析

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, “通道 1”分别设为 2.33×10^6 、 2.33×10^5 、 2.33×10^4 、 2.33×10^3 , 2.33×10^2 , “通道 4”分别设为 2.33×10^6 、 2.33×10^5 、 2.33×10^4 、 2.33×10^3 , 2.33×10^2 (单位为 copies/ μL), 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

2. 待测样品将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。

3. 在“实验分析”页面点击 , 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 copies/ μL 。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

通过选择不同的探针, 对 CAR 或 TCR 基因及 SCG 基因进行分析。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 **0.02**, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值, 例如 SCG 设为 $2.33\text{e}+006$ 、 $2.33\text{e}+005$ 、 $2.33\text{e}+004$ 、 $2.33\text{e}+003$ 、 $2.33\text{e}+002$ (单位为 copies/ μL), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3. 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S 之后点击 。

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的 CAR 或 TCR 和 SCG 检测值, 单位为 copies/ μL 。

6. 无模板对照 NTC 检测结果应大于标准曲线最低浓度点的 Ct 值。

7. 分析 IPC 的 Ct 值, 正常情况下样品的 Ct-IPC 值应该与阴性质控 NCS 的 Ct-IPC

值一致或±1。如样品的 Ct-IPC 值与阴性质控 NCS 的 Ct-IPC 值相比明显增大，则表明样品可能存在抑制。

8. 结果计算:

$$\text{CAR 或 TCR copies/cell} = 2 \times \text{CAR 或 TCR/SCG}$$

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

修订日期: 2023 年 03 月 23 日

生效日期: 2023 年 03 月 29 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910