

RCR 基因拷贝数检测试剂盒

（RT-PCR 荧光探针法）

说明书

货号：1403442

版本：A/0

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® RCR 基因拷贝数检测试剂盒适用于定量检测逆转录病毒载体生产的细胞治疗产品和基因治疗产品中复制型逆转录病毒 RCR，如生产病毒的细胞库、终末细胞、病毒载体及 CAR-NK 细胞。

本试剂盒基于荧光探针法，采用荧光探针 RT-PCR 的方法检测逆转录病毒载体上特定序列。试剂盒配套有 RCR 定量参考品。本试剂盒检测快速，专一性强，性能可靠，与 SHENTEK®病毒核酸提取试剂盒配套使用，准确定量样品中可复制性逆转录病毒 RCR 的拷贝数。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
RCR 定量参考品	NNA046	冻干粉, 1 管	-18 °C及以下
5×RT-qPCR Buffer	NNC078	600 µL × 1 管	-18 °C及以下
RT-qPCR Enzyme MIX	NNC079	100 µL × 1 管	-18 °C及以下, 避光
RCR Primer & Probe MIX	NNC080	300 µL × 1 管	-18 °C及以下, 避光
RNase-Free H ₂ O	NND008	1.2 mL × 3 管	-18 °C及以下
ddH ₂ O	NND010	1 mL × 1 管	-18 °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
- qTOWER³G 定量 PCR 系统
- Roche 480 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL RNase Free 低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 迷你离心机
- 旋涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程

❖ RCR 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

注: 第一次使用时, 需将 RCR 定量参考品冻干粉管子置于离心机 10000 rpm/min 离心 15 s, 使所有粉末集中于管底, 再在管中加入 55 μL ddH₂O, 配成 RCR DNA 定量参考品。

 为保证冻干粉充分溶解, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 s, 如此重复 3 次, 再静置 10 min 后使用。

RCR 定量参考品浓度标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 RNase-Free H₂O 将定量参考品进行稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中复溶后 RCR 定量参考品和 RNase-Free H₂O 置于冰上或 2-8 °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 8 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
3. 在 ST 管中用 RNase-Free H₂O 将 RCR 定量参考品稀释至 5×10^8 copies/ μL , 得到 ST, 振荡混匀短时间快速离心 3-5 s 后, 重复 3 次以确保定量参考品与 RNase-Free H₂O 充分混匀。
4. 再在 ST0 管中用 RNase-Free H₂O 将 ST 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 RNase-Free H₂O 充分混匀。
5. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 90 μL RNase-Free H₂O。
6. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

表 2. RCR 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度（copies/μL）
ST1	10 μL ST0+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ⁶
ST2	10 μL ST1+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ⁵
ST3	10 μL ST2+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ⁴
ST4	10 μL ST3+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ³
ST5	10 μL ST4+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ²
ST6	10 μL ST5+90 μL RNase-Free H ₂ O	5 × 10 ¹

- 已融化未使用的 RNase-Free H₂O 可保存于 2-8 °C。
- 标准曲线浓度点选择 ST2-ST6，可根据实际验证结果选择，应至少 5 个浓度点。

❖ 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控，具体操作如下：

取 100 μL 样品基质溶液（或 RNase-Free H₂O）加入 1.5 mL 干净的离心管中标记为阴性质控 NCS。

阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样本前处理步骤，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ qRT-PCR 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 个阴性质控对照 NCS+待测样品数）× 3

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qRT-PCR MIX 总量：

qRT-PCR MIX =（反应孔数+2）× 10 μL（含有 2 孔的损失量）

3. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化，并根据表 3 所示加样：

表 3. qRT-PCR MIX 配制表

组分	单孔反应
5×RT-qPCR Buffer	6 μL
RT-qPCR Enzyme MIX	1 μL
RCR Primer & Probe MIX	3 μL
总体积	10 μL

4. 上述各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	10 μL qRT-PCR MIX +20 μL ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
无模板对照 NTC	10 μL qRT-PCR MIX + 20 μL RNase-Free H ₂ O
阴性质控 NCS	10 μL qRT-PCR MIX + 20 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	10 μL qRT-PCR MIX + 20 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

S1	S1	S1		NCS	NCS	NCS						A
S2	S2	S2		NTC	NTC	NTC						B
S3	S3	S3							ST6	ST6	ST6	C
									ST5	ST5	ST5	D
									ST4	ST4	ST4	E
									ST3	ST3	ST3	F
									ST2	ST2	ST2	G
												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 RCR 标准曲线（ST2-ST6）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样品（S1-S3）。建议每个检测做 3 个重复孔。

 实际检测时可根据样品多少, 参照表 5 示例进行 96 孔板排版加样。

5. 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 程序参数设置

✧ 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”页面中选择检测 RCR 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**RCR 基因拷贝数检测**”程序。

3. “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:

 选择 FAM 通道代表 RCR 检测信号。

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 RCR-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none。

3. 设置反应程序: **50 °C, 15min; 95 °C, 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (读取荧光), 40 个循环**; 反应体积 30 μ L。

❖ 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, 并进行赋值, 设为“5e+005、5e+004、5e+003、5e+002、5e+001”, 并在相应的“样本名称”中命名为 ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

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/ μ L)。

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

1. 在 Results 的 Amplification Plot 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 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, 设为 5e+005、5e+004、5e+003、5e+002、5e+001 (单位为 copies/ μ L), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

3. 在 Results 的 Plate 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 中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、待测样品的检测值, 单位为 copies/ μ L。

6. NTC 的 Ct 均值应不小于 35 或未检出, NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

 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。

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