

PerfectStart[®] CAR/TCR Quantification Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DH181

版本号: Version 1.0

保存: -20°C保存两年。

产品说明

本产品用于定量检测来源于 HIV-1 型慢病毒载体技术制备的人源细胞产品, 如 CAR-T 或 TCR-T 细胞基因组中 CAR 或 TCR 基因的拷贝数。本产品基于荧光探针定量 PCR 原理, 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 序列和人源细胞中单拷贝基因(Single Copy Gene, SCG), 计算得到样本中平均每个细胞的目的基因拷贝数。本产品含 PerfectStart Taq 热启动酶 (利用 3 种单克隆抗体与 Taq DNA Polymerase 高效结合, 有效地封闭了 DNA 聚合酶活性, 阻止了低温下的非特异性扩增)、特殊优化的 qPCR 反应缓冲液、dNTPs、PCR 增强剂、稳定剂。此外, 本反应液引入了 dUTP/UDG 系统, 可在反转录前降解含 U 的 ssDNA 和 dsDNA, 消除由 PCR 产物导致的交叉污染。

特点

- 3 种抗体封闭, 特异性高, 灵敏度高, 扩增效率高, 适用样品范围广。
- 特殊优化的 qPCR 反应缓冲液, 可提供更高的延伸速度、灵敏度和特异性。
- 使用 UDG 酶和 dUTP, 有效防止 PCR 产物的交叉污染, 数据准确。

产品组成

组分名称	DH181-01	主要成分
2×CAR/TCR qPCR SuperMix	2×750 μL	PCR 酶, dNTPs, Mg 离子, PCR 缓冲液等
7.5×CAR/TCR 引物探针混合液	400 μL	三重引物探针
CAR/TCR 定量参考品 (3×10 ⁸ copies/μL)	50 μL	含有 CAR/TCR 和 SCG 的 DNA, 并且拷贝数一致
30×IPC	100 μL	内标模板
DNA 稀释液	3×1 mL	
无核酸酶的水	1 mL	

适用仪器: 适用但不限于 ABI 系列、Bio-Rad CFX 系列、博日 LineGene 9600 Plus 等荧光 PCR 仪。

检验方法

1、标准曲线样品准备 (在样品处理区进行)

- (1) 取出试剂盒中 CAR/TCR 定量参考品以及 DNA 稀释液, 冰上放置待完全融化后, 轻柔振荡混匀瞬时离心;
- (2) 梯度稀释: 取干净 1.5 mL 离心管 7 支, 标为 S0、S1、S2、S3、S4、S5 和 S6, 并在每管中加入 90 μL DNA 稀释液。从 S0 中取 10 μL 加至 S1 中, 振荡混匀并瞬时离心。再从 S1 中取 10 μL 至 S2 中, 以此类推重复上述步骤进行梯度稀释。

参考品 S0-S6 浓度如下:

稀释管	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
CAR/TCR 浓度 (copies/μL)	3×10 ⁷	3×10 ⁶	3×10 ⁵	3×10 ⁴	3×10 ³	3×10 ²	3×10 ¹
SCG 浓度 (copies/μL)	3×10 ⁷	3×10 ⁶	3×10 ⁵	3×10 ⁴	3×10 ³	3×10 ²	3×10 ¹

- (3) 稀释得到的 S1-S6 作为标准曲线样品放置于冰上备用, S0 留存。实验结束后剩余参考品以及稀释液建议保存于 -20°C, 且建议参考品 S1-S6 在一周内使用。

2、试剂准备 (在试剂准备区进行)

- (1) 取出试剂盒中的各组分以及自备试剂, 室温放置, 待温度平衡至室温, 混匀后备用;
- (2) qPCR 工作液配制 (整个过程中避免被光源直射)



根据所检测的样品数量按照下表配制反应液，建议每次检测均设置阴性对照。

待检样品数为n时，需配制反应体系系数N=【待检样品数(n)+标准曲线样品(6)+阴性对照NTC(1)】×重复孔数+1。

组分名称	组分用量	工作浓度
2×CAR/TCR qPCR SuperMix	15 μL × N	1×
7.5×CAR/TCR引物探针混合液	4 μL × N	1×
30×IPC	1 μL × N	1×

(3) 将配制好的qPCR工作液充分混匀后瞬时离心，待用。

3、加样 (在样品处理区进行)

向每个PCR管中分装加入前一步准备好的qPCR工作液20 μL，并在相应孔中按顺序分别添加10 μL模板：阴性对照NTC、待测样品、标准曲线样品(S1-S6)。建议以上三类样品在反应孔设计布板时分区放置，以免互相污染，导致测试结果不准确。盖上管盖或使用光学膜封闭后，轻柔振荡混匀，离心使液体全部沉于管底。

4、qPCR扩增 (在扩增与分析区进行)

将PCR反应管放入扩增仪样品槽，按照对应顺序设置阴性对照、待测样品、标准曲线样品，并设置样品名称。

(1) 荧光通道选择

选择FAM通道 (Reporter: FAM, Quencher : none) 检测CAR/TCR；

选择VIC通道 (Reporter: VIC, Quencher : none) 检测IPC；

选择CY5通道 (Reporter: CY5, Quencher : none) 检测SCG；

参比荧光 (Passive Reference) 可根据机型选择添加为ROX或设置为none。

设置反应体系为30 μL。

(2) qPCR扩增程序设置

温度	时间	循环数	信号采集
95°C	5 min	1	
95°C	5 s	40	
60°C	30 s		√

5、结果分析

在结果分析软件中，将相应反应孔的样品类型分别设置为NTC (阴性对照)、Unknown (待测样品)以及Standard (标准曲线样品)，并对Standard样品的浓度赋值(单位为copies/μL)。设置完成后运行分析，软件自动生成标准曲线与扩增曲线以及相应数值。生成的标准曲线相关系数R²应不低于0.99，斜率应位于-3.1~-3.6之间 (表示扩增效率位于90%~110%之间)。

NTC (阴性对照) 样品Ct值应为无显示或≥38。待测样品浓度根据标准曲线自动生成后，换算出原样品中基因的拷贝数。每个细胞中CAR或TCR的拷贝数=2×CAR或TCR拷贝数÷SCG拷贝数。

IPC作为反应中抑制性的判断标准，样品的Ct (IPC) 若与定量参考品以及NTC样品的Ct (IPC) 差异 > 1，则认为样品中可能存在抑制。

标准曲线需要进行调整时，可参照以下原则：

- 根据复孔间 Ct 值差异≤0.3 的原则，可对DNA Standards原始 Ct 值进行过滤。
- NTC阴性对照应比标准曲线最低浓度Ct值大或者无显示。
- 结果分析的参数设置需依据具体的机型和软件版本，一般由仪器自动判读。但有时系统给出的阈值线离基线太近，导致复孔之间 Ct 值相差甚远，可手动调节阈值线至合适位置。此时可初步查看扩增曲线形态和扩增效率是否正常，再进行数据分析。



- 为了确保定量准确，请至少使用 5 个浓度梯度制作标准曲线。
- 如果标准曲线参数不佳，超出了有效范围，建议重新进行定量。

6、质控样品

在测试过程中，为确保实验结果的可信度，可增加加样回收质控ERC样品以及阴性质控NCS样品，同步进行核酸提取、检测步骤。建议的样品配制方法如下：

- 加样回收质控ERC样品：180 μ L待测样品中加入20 μ L S3，混匀作为ERC；
- 阴性质控NCS样品：200 μ L DNA稀释液（或生物制品基础溶液），作为NCS。

二者的质控判断标准如下：

- 根据待测样本和样本ERC的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在50%~150%之间。
- NCS的Ct值应大于标曲最低浓度Ct值。

检验方法的局限性

不合理的样品采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

产品性能指标

具体参考产品性能报告。

注意事项

- 本产品仅用于科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理需严格遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所有消耗品仅作一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用仪器和设备，各区各阶段用品不可交叉使用。所有检测样品均视为具有传染性的物质，实验过程中穿工作服并经常更换手套，以避免样品间的交叉污染；样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求：《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 所有试剂使用前均需彻底化冻、混匀。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202404

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

