RCR 基因拷贝数检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

货号：BP-QN14-100

版本：02 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

【产品名称】

RCR 基因拷贝数检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

100 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒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可复制型逆转录病毒 RCR。

【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对 GALV 基因设计引物探针，能够定量检测细胞治疗产品和基因治疗产品中可复制型逆转录病毒 RCR 的拷贝数。试剂盒含有内标，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒Ⅲ（磁珠法）配套使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格（100 Reactions/盒）
RCR qPCR MIX1	0.9mL×2 管
RCR qPCR MIX2	0.2mL×1 管
RCR 阴性对照	1.0mL×2 管
RCR 校准品 ST1	0.5mL×1 管（5×10^{0}copies/μL）
RCR 校准品 ST2	0.5mL×1 管（5×10^{1}copies/μL）
RCR 校准品 ST3	0.5mL×1 管（5×10^{2}copies/μL）
RCR 校准品 ST4	0.5mL×1 管（5×10^{3}copies/μL）
RCR 校准品 ST5	0.5mL×1 管（5×10^{4}copies/μL）
RCR 校准品 ST6	0.5mL×1 管（5×10^{5}copies/μL）

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。

【储存条件及有效期】

1、置于≤-20℃下避光保存，有效期 24 个月。

2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。

3、产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【检验方法】

从试剂盒中取出 RCR qPCR MIX1、RCR qPCR MIX2、RCR 阴性对照、RCR 校准品 ST1-ST6，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1. 加样回收质控 ERC 制备

根据需要设置 ERC 中的 RCR 加样浓度（以制备加 5×10^{5}copies 线性 RCR 的 ERC 为例），具体操作如下：

1）取 100μL 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。

2）加入 10μL RCR 校准品 ST5 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

2. 反应液准备

2.1 根据待测标本数，计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样。

PCR 反应液数=（6 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS+待测样本+待测样本 ERC）×3+1 孔损耗量。然后按照 20μL/反应的量将 RCR qPCR MIX 反应液分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中（RCR qPCR MIX 配制方法参考 2.2 表格）。

2.2 RCR qPCR MIX 配制方法：

组分	单孔用量（μL）
RCR qPCR MIX1	18
RCR qPCR MIX2	2
总体积	20

2.3 各反应孔加样示例：

组分	加样量
标准曲线	20μL RCR qPCR MIX + 20μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20μL RCR qPCR MIX + 20μL 阴性对照
NCS	20μL RCR qPCR MIX + 20μL NCS 纯化液
待测样本	20μL RCR qPCR MIX + 20μL 待测样本纯化液
样本 ERC	20μL RCR qPCR MIX + 20μL 样本 ERC 纯化液

3. 样本核酸提取

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100μL。

4. 荧光 PCR 反应

4.1 按照 2.3 的方法将核酸加入到 RCR qPCR MIX 中，盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	25℃：5 分钟	1
反转录	50℃：30 分钟	1
预变性	95℃：3 分钟	1
PCR 扩增	95℃：10 秒，60℃（采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX，其中 FAM 为 RCR 基因，ROX 为内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 none。

5. 结果判定

5.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，需要根据扩增曲线自行调整阈值线。

5.2 内标的判读

对于阴性结果内标 Ct 值应≤33；对于阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致阳性结果内标不出值或者出值较差。

5.3 试验成立条件

NTC、NCS 的 FAM 通道显示无 Ct 值或无典型扩增曲线；标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$。

6. 结果分析

6.1 以 SLAN-96P 为例：

1）若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到合适高度；

2）在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏分别赋值为 5×10^5、5×10^4、5×10^3、5×10^2、5×10^1、5（含义为每孔的 RCR 浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1；

3）在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率；

4）在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/μL。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。

6.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例：

1)若需要调整阈值线,在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中,将 FAM 通道、ROX 通道 Threshold 设置到合适高度，点击 Analyze；

2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 5×10^5、5×10^4、5×10^3、5×10^2、5×10^1、5（含义为每孔的 RCR 浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 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、ERC；

3）在 Analysis 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、R^2 等；

4)在 Analysis 的 View Well Table 面板中,Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值,单位为 copies/μL。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。

【注意事项】

1、试剂盒应在-20℃以下保存运输。

2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。

3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。

4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。

5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。

6、对于顶部采光仪器要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触反应管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。

7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。

8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。

9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。

10、如果样本为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。

11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【免责声明】

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn
网址：www.biori.com