

RCA (E1A) Copynumber Detection Kit

RCA (E1A)基因拷贝数检测试剂盒

产品简介

RCA (E1A)基因拷贝数检测试剂盒可用于定量分析检测各种使用腺病毒载体相关的细胞治疗产品和基因治疗产品中可能发生的复制型腺病毒(Replication-competent Adenoviruses, RCA)的潜在风险; 还可用于定量分析检测生物制品中宿主细胞, 如 HEK293 和 HEK293T 细胞来源的风险基因 E1A 残留 DNA 的含量。

本试剂盒针对腺病毒上 E1A 基因序列设计特异性引物, 采用探针法荧光定量 PCR 原理, 快速特异的检测复制型腺病毒 RCA 风险情况以及宿主细胞来源的 E1A 残留 DNA, 其定量限可低至 4.1 copies/ μ L 水平, 且配套有 RCA (E1A) DNA Control (DNA 定量参考品)。该试剂可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(Cat#18461ES/18462ES)配套使用。

产品信息

货号	41321ES50 / 41321ES60
规格	50 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41321ES50	41321ES60
41321-A	RCA (E1A) qPCR Mix	0.75 mL	1.5 mL
41321-B	RCA (E1A)Primer&Probe Mix	200 μ L	400 μ L
41321-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL \times 2 管	1.8 mL \times 4 管
41321-D	RCA (E1A) DNA Control (1.64×10^7 copies/ μ L)	25 μ L	50 μ L
41321-E	IC [*]	50 μ L	100 μ L

*IC: Internal control, 内部对照

储存条件

1. 所有组分均干冰运输, -25~-15 $^{\circ}$ C保存, 有效期 2 年。其中, 41321-A 和 41321-B 均需避光保存。
2. 收到货后, 请检查共 5 个组分是否齐全, 并立即放入对应的保存温度中储存。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读说明书, 实验应规范操作, 包括样本处理、反应体系的配制及加样。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀, 低速离心。

适用机型

包含但不限于以下仪器:

Thermo Scientific: ABI 7500, ABI Quant Studio 5;

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

使用说明

1. RCA (E1A) DNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 RCA (E1A) DNA Control 定量参考品进行梯度稀释^{*}，稀释浓度依次为 1.64×10^6 copies/ μ L、 1.64×10^5 copies/ μ L、 1.64×10^4 copies/ μ L、 1.64×10^3 copies/ μ L、 1.64×10^2 copies/ μ L、 1.64×10^1 copies/ μ L。具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 RCA (E1A) DNA Control 定量参考品和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加入 90 μ L DNA Dilution Buffer 和 10 μ L RCA DNA Control 定量参考品，Std0 即稀释为 1.64×10^6 copies/ μ L 的浓度，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 短期保存（不超过 3 个月）^{**}，使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5 离心管中先分别加入 90 μ L DNA Dilution Buffer^{***}，再进行梯度稀释^{****}，具体稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 μ L Std0 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	1.64×10^5 copies/ μ L
Std2	10 μ L Std1 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	1.64×10^4 copies/ μ L
Std3	10 μ L Std2 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	1.64×10^3 copies/ μ L
Std4	10 μ L Std3 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	1.64×10^2 copies/ μ L
Std5	10 μ L Std4 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	1.64×10^1 copies/ μ L

表 1 标准品梯度稀释

^{*}每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 1.64×10^5 copies/ μ L~ 1.64×10^1 copies/ μ L 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。

^{**}为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

^{***}已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 $2-8^\circ\text{C}$ 7 天，若长时间不用，请放置于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

^{****}为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 15 sec。

2. 待测样本 TS 的制备

根据实验设置待测样本 TS，具体操作如下：

取 100 μ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 TS，进行样本前处理，制备待测样本 TS 纯化液。

3. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 RCA (E1A) DNA 标准品浓度，以制备加 1.64×10^4 copies RCA (E1A) DNA 量的 ERC 为例^{*}，具体操作如下：

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，再加入 10 μ L Std3，混匀，标记为 ERC。
- 2) 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 ERC 纯化液。

^{*}一般建议样本加标量设置在样本中目的基因 RCA (E1A) 实际含量的 0.8~1.5 倍，如果样品中目的基因含量低于定量限，加标量应设置到定量限之内，以保证检测结果的可靠性。

4. 阴性抽提质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100 μ L 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。

2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

5. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

- 1) 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。
- 2) 每管或孔中 NTC 样本为 20 μL Mix 混合液即 15 μL RCA (E1A) qPCR Mix + 4 μL RCA Primer&Probe Mix + 1 μL IC，再加 10 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

6. 反应体系

组分	体积(μL)
RCA (E1A) qPCR Mix [*]	15
RCA (E1A) Primer&Probe Mix	4
IC	1
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 2 标准品反应体系

^{*}根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量：Mix 混合液=（反应孔数+2） \times （15+4+1） μL （含有 2 孔的损失量）。通常，每个样本做 3 个重复孔。

^{**}反应孔数=（5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性抽提质控 NCS+待测样 TS 个数+待测样本对应加标回收 ERC 个数） \times 3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后，所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

ERC (Extraction Recovery Control): 待测样本中加入如 10 μL 的 1.64×10^3 copies/ μL 标准品后进行样本前处理，所得纯化液为加标回收 ERC

^{***}加样完成密封好管子后，请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，再震荡混匀 5 sec 以上，完全混匀反应液，再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，如有气泡，需将气泡排尽。

下表为参考板位：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		待测样本 TS1	待测样本 TS1	待测样本 TS1		标准曲线 Std1	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1			
B	NTC		待测样本 TS2	待测样本 TS2	待测样本 TS2		标准曲线 Std2	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2			
C	NTC		待测样本 TS3	待测样本 TS3	待测样本 TS3		标准曲线 Std3	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3			
D							标准曲线 Std4	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4			
E	NCS		样本加标 ERC1	样本加标 ERC1	样本加标 ERC1		标准曲线 Std5	标准曲线 Std5	标准曲线 Std5			
F	NCS		样本加标 ERC2	样本加标 ERC2	样本加标 ERC2							
G	NCS		样本加标 ERC3	样本加标 ERC3	样本加标 ERC3							
H												

表 3 上机参考板位

该示例是对 RCA (E1A)基因拷贝数的 qPCR 法检测操作的展示，检测样本包括：5 个浓度梯度的 RCA (E1A) DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 TS、3 个加样回收 ERC。建议每个样本做 3 个重复孔。

7. 扩增程序参数设置（两步法）（以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例）

- 1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

2) 创建 2 个检测探针，Target 1 命名为“RCA (E1A)-DNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为“None”；Target 2 命名为“IC”，选择报告荧光基团为“CY5”，猝灭荧光基团为“None”。参比荧光为“ROX”（参比荧光可根据仪器型号等情况，选择是否需要添加）。

3) 在“Assign target (s) to the selected wells”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“164000”、“16400”、“1640”、“164”、“16.4”（含义为每孔 DNA 浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏命名为“164000copies/μL”、“16400copies/μL”、“1640copies/μL”、“164copies/μL”、“16.4copies/μL”；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 TS 孔、样本加标回收 ERC 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“TS”、“ERC”，参比荧光勾选“ROX”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

4) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 30 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火/延伸 (收集荧光)	60°C	30 sec	

表 4 扩增程序

8. qPCR 结果分析

1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置，点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内，Slope 在 -3.6~-3.1。

3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS、样本加标回收 ERC 的检测值，单位为 copies/μL。

4) 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

5) 根据待测样本 TS 和样本加标回收 ERC 的检测结果计算加标回收率，加标回收率要求在 50%~150% 之间。加标回收率计算公式： $\text{回收率}(\%) = \{\text{样本加标测定值}(\text{eg. copies}/\mu\text{L}) - \text{样本测定值}(\text{eg. copies}/\mu\text{L})\} \times \text{洗脱体积}(\text{eg. } \mu\text{L}) / \text{DNA 加入量理论值}(\text{eg. copies}) \times 100\%$ 。

6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。

7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。

8) 待测样本的 Ct-IC 值应该与 NTC 的 Ct-IC 值一致或 ± 1 ，如果待测样本的 Ct-IC 值与 NTC 的 Ct-IC 值相比明显增大，则表明样本可能存在明显抑制。如果同时测试加标样本，则优先考虑样本加标回收率结果，IC 结果作为参考。