

Code No. 6166

研究用

Takara

Retrovirus Titer Set
(for Real Time PCR)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 操作注意事项	1
● 操作方法	2
● 实 验 例	4
● 附 录	6
● 关联产品	6

● 制品说明

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)是利用 Real Time RT-PCR 法测定基于 MLV (murine leukemia virus: 小鼠白血病病毒)改造的逆转录病毒载体的基因组 RNA 量, 确定逆转录病毒滴定度的制品。本制品与 One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/RR086A) 一起使用, 4 小时内即能直接测定病毒上清液中 RNA 的滴定度。另外, 本制品扩增的是 MLV 病毒包装信号的序列区, 可以测定几乎所有的以 MLV 为基础改造的逆转录病毒载体的 RNA 滴定度。

逆转录病毒载体感染效率测定时, 目的细胞被逆转录病毒载体感染后, 通常是利用荧光和抗药性等测定感染效率, 然后算出滴定度。这个方法最少需要数日, 而且, 如果没有报告基因和抗药性基因, 使用此方法不能进行测定。另外, 根据生物学滴定度决定感染复数(MOI)进行细胞感染时, 滴定度测定需要数日, 因此病毒上清液需要冷冻保存, 冻融容易使病毒滴定度降低, 并造成感染复数 (MOI) 不准, 同时易造成污染。

本制品是对逆转录病毒载体的基因组 RNA 量进行测定, 对没有报告基因和抗药性基因的逆转录病毒载体也能够测定滴定度。由于在 4 小时内即可得到测定结果, 因此病毒上清液不需要冷冻保存, 并可以根据测定的感染复数 (MOI) 进行感染。

配套使用的 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 是采用嵌合荧光染料法进行 One Step RT-PCR 反应的专用试剂。本制品中使用了适合于 Real Time RT-PCR 的反转录酶 PrimeScript RTase (RTase H free) 和 *TaKaRa Ex Taq[®] HS*, 具有高扩增效率和高扩增特异性, 能进行稳定的 Real Time One Step RT-PCR 反应。

● 制品内容 (100 次量; 25 μ l 反应体系) *1

Forward Titer Primer FRT-1 (10 pmol/ μ l)	50 μ l
Reverse Titer primer RRT-1 (10 pmol/ μ l)	50 μ l
RNA Control Template (5×10^8 copies/ μ l)	10 μ l
EASY Dilution (for Real Time PCR)	2 \times 1 ml
DNase I (RNase Free) (5 U/ μ l)	40 μ l
10 \times DNase I Buffer	50 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	10 μ l

*1 Real Time RT-PCR 100 次反应, DNase I 可以处理 20 次。

试剂盒以外所需试剂

One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A)或
One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A)
RNase-Free Water

● 保 存:

-20 $^{\circ}$ C

Note: 为了避免 RNA Control Template 反复冻融导致降解, 请分成小包装 -70 $^{\circ}$ C ~ -80 $^{\circ}$ C 保存使用。

● 操作注意事项

以下为本制品的使用注意事项, 使用前请务必认真阅读。

- (1) 应先配制各种试剂的混合液, 将 RNase Free dH₂O、buffer 和酶等配制成 Master Mix, 可以减少试剂的损失及分注、混合的次数, 使所取得试剂体积更准确, 可以防止实验结果之间产生的误差。
- (2) One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 中含有的 *TaKaRa Ex Taq HS* 和 PrimeScript RT Enzyme Mix II, 或者 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II 中含有的 PrimeScript 1step Enzyme Mix 2, 使用前请轻离心至 Tube 底部后再使用; 由于酶保存液中含有 50% 的甘油, 粘度高, 分取时应慢慢吸取; 酶类制品应在实验前从 -20 $^{\circ}$ C 中取出, 使用后立即放入 -20 $^{\circ}$ C 保

存。

- (3) One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 中含有的2×One Step TB Green RT-PCR Buffer III, 或One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II中含有的2×One Step TB Green RT-PCR Buffer 4在融解时可能会有沉淀物产生, 溶解后不影响制品。使用Vortex使其完全溶解后再使用。
- (4) 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip), 以防止样品间污染。

● 操作方法

请按照 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit 或 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II 的说明书以及各种仪器的操作说明书进行操作。

1. 滴定度测定用病毒上清液的制备

当使用逆转录病毒对细胞进行转染时, 病毒上清液中会存在大量用于转染的质粒。因此, 当上清液直接用于 Real Time RT-PCR 时, 会造成很高的背景。当病毒基因稳定整合后, 通常不需要使用 DNase I 处理。然而, 在制备病毒载体时, 由于基因组 DNA 的溶出, 仍然会造成很高的背景。因此, 建议使用 DNase I 进行处理。

① 按下列组分配制反应液。(1次反应体系)*¹

病毒上清液	12.5 μl
10×DNase I Buffer	2.5 μl
DNase I (RNase Free) (5 U/μl)	2.0 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
RNase Free dH ₂ O	7.5 μl
Total	25 μl

② 按以下条件进行 DNase I 处理

37°C、30 min

70°C、10 min

*1: 本 Kit 含有 20 次 DNase I 处理的试剂, 如果试剂使用完请单独购买以下制品

Recombinant DNase I (RNase Free) (Code No. 2270A)*²

*2: 含有 10×DNase I Buffer

Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Code No. 2313A)

2. 制备标准曲线用标准品

标准曲线制作方法有以下 2 种

- 使用 RNA Control Template 制作标准曲线法

使用 Kit 中的 RNA Control Template 进行 Real Time RT-PCR 反应, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算出病毒 RNA 的滴定度, 得到的数值是上清液中含有的逆转录病毒 RNA。为了测定检测样品生物学滴定度, 应与已知生物学滴定度的逆转录病毒载体 (与检测样品载体相同, 制备方法应相同) 一起进行测定 RNA 滴定度。通过标准曲线比较 RNA 滴定度, 来确定检测样品的生物学滴定度。

- 使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体制作标准曲线法

使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体, 梯度稀释后进行 Real Time RT-PCR 反应, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算出被检病毒的滴定度。制作标准曲线用的逆转录病毒载体和被检病毒的载体应相同, 制备方法应相同。

2-1: 使用 RNA Control Template 制作标准曲线时

参考以下顺序, 进行 RNA Control Template 的梯度稀释*1。

- 1) 使用 EASY Dilution (for Real Time PCR) 将 RNA Control Template (5×10^8 copies/ μ l) 稀释 5 倍, 成为 1×10^8 copies/ μ l (Tube 1)。
- 2) 在新 Tube 中分别加入 18 μ l EASY Dilution (for Real Time PCR) (Tube 2-6)
- 3) 从充分混合好 Tube 1 (1×10^8 copies/ μ l) 中取 2 μ l 加入到 Tube 2 中, 充分混合。
- 4) 从 Tube 2 中取 2 μ l 加入到 Tube 3 中, 充分混合。
- 5) 重复上述操作, 梯度稀释至 Tube 6。

Tube	RNA 溶液 (μ l)	EASY Dilution (μ l)	拷贝数 (copies/ μ l)
1	2	8	1×10^8
2	2	18	1×10^7
3	2	18	1×10^6
4	2	18	1×10^5
5	2	18	1×10^4
6	2	18	1×10^3

*1 可以根据具体情况对 RNA Control Template 使用量和稀释倍数进行调整。

2-2: 使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体制作标准曲线时

使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体梯度稀释 (10 倍, 5 倍等梯度稀释), 制备成梯度稀释液。*1
(实验例 2)

*1: 为了保证相同条件, 建议使用制备逆转录病毒载体时的培养基来制备连续梯度稀释液。

3. Real Time RT-PCR 反应液的配制 (使用 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit)

按照以下组分配制反应液 (请在冰上进行操作) *1

<1 次反应体系>*2

试剂	使用量	终浓度
2×One Step TB Green RT-PCR Buffer III *3	12.5 μ l	1×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l) *3	0.5 μ l	
PrimeScript RT Enzyme Mix II *3	0.5 μ l	
Forward Titer Primer FRT-1 (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ M
Reverse Titer primer RRT-1 (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ M
病毒上清液或者标准品 *4, 5	2 μ l	
RNase Free dH ₂ O *3	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

*1: 说明书中是使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900: 终卖) 的条件。使用其他仪器时, 请根据各仪器说明书进行操作。

*2: 为了得到准确数据, 病毒上清液和标准品每个样品请进行 2 个以上反应。

*3: One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A) 的组分。

*4: 参考操作方法 1, 对逆转录病毒载体进行 DNase I 处理。

*5: 制备的病毒培养基中含有血清等反应阻害物, 这种情况下请把病毒上清液数倍~数十倍稀释后再使用。

另外, 预先确认合适的稀释倍数, 尽量在对反应无阻害范围内进行测定。(实验例 1)

4. 反应开始 (使用 Thermal Cycler Dice Real Time System // (终卖) 的操作方法) *1

将反应 Tube 或 Plate 轻微离心后, 放入 Thermal Cycler Dice Real Time System // (终卖) 中, 按以下程序开始反应。

Pattern 1: 反转录反应

Hold

42°C 5 min

95°C 10 sec

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec (荧光检测: FAM)

Pattern 3: Dissociation

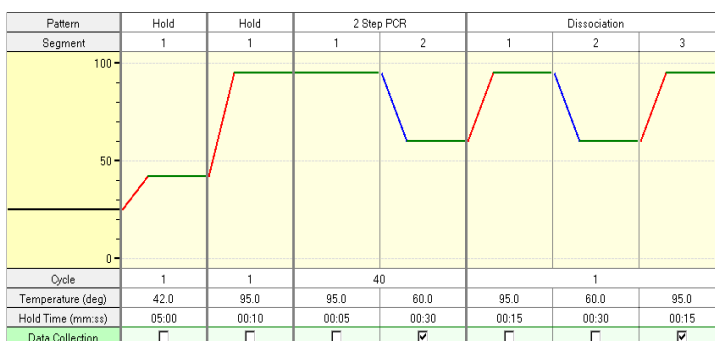


图 1. Thermal Profile Setup 界面

*1: 上述是使用 Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No.TP900: 终卖) 的反应条件。
使用其他仪器时, 请根据各仪器说明书进行操作。

5. 结果分析

反应结束后, 确认扩增曲线和融解曲线, 制作标准曲线, 对检测样品进行定量。

● 实验例

实验例 1: 逆转录病毒制备用培养基的反应阻害性确认

1) 方法

用于构建逆转录病毒的细胞, 分别在无血清培养基 (GT-T-Retrol) 和含血清培养基 (DMEM, 10%FBS) 中进行培养。对于两种培养方法制备的逆转录病毒载体, 分别进行 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释后, 连同原液一起按上述方法进行 Real Time RT-PCR 反应。稀释液分别使用制备各样品时对应的培养基。

2) 结果

图 2 (含血清培养基) 和图 3 (无血清培养基) 表示稀释倍数和 Ct 值关系图。由以下结果可以看出两种培养基对反应没有明显的阻害。

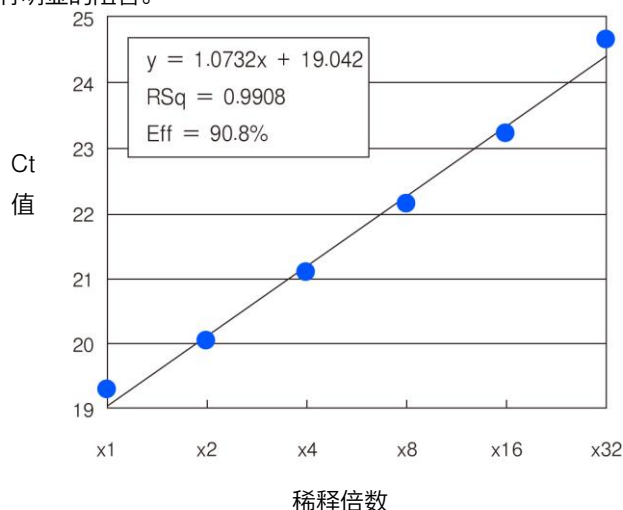


图 2: 用含血清培养基 (DMEM, 10% FBS) 制备的逆转录病毒载体的稀释倍数和 Ct 值

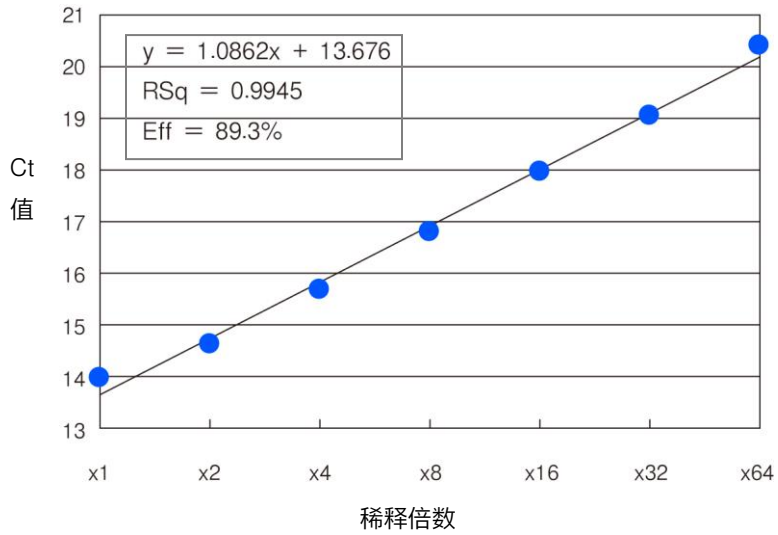


图 3: 用无血清培养基 (GT-Retro I) 制备的逆转录病毒载体的稀释倍数和 Ct 值

实验例 2: 使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体制作标准曲线

1) 方法

首先使用带有 ZsGreen 基因的逆转录病毒载体感染 HT1080 细胞, 并在含有血清培养基 (DMEM, 10% FBS) 中进行培养。通过流式细胞术 (FACS) 解析, 计算出生物学滴定度 (1.82×10^6 ivp/ml)。然后使用相同培养基把逆转录病毒载体稀释 10 倍、100 倍、1000 倍, 连同原液一起进行 DNase I 处理。接着按照上述方法进行 Real Time RT-PCR 反应, 并制作标准曲线。

2) 结果

得到如图 4 所示的高准确度的标准曲线

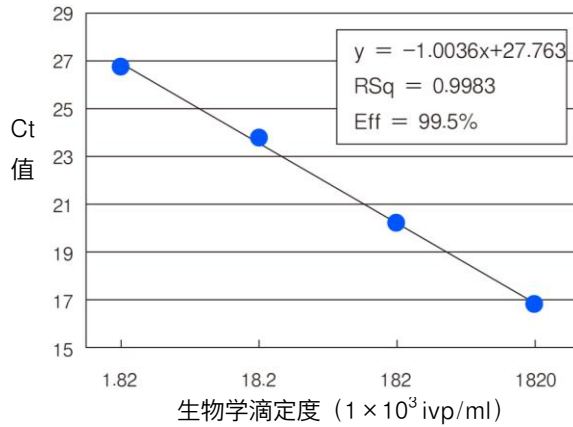


图 4: 使用已知生物学滴定度的逆转录病毒载体制作标准曲线

● 附 录

关于 RNA Control Template 使用方法

为了制作准确的标准曲线，要尽量避免 RNA Control Template 的降解，防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶污染。在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

● 关联产品

8联Tube & Cap

0.2 ml Hi-8-Tube/0.2 ml Hi-8-Flat Cap (Code No. NJ300/NJ302)

逆转录病毒载体用高效率导入试剂

RetroNectin[®] (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (Code No. T100A/B)

逆转录病毒载体构建Kit

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161)

逆转录病毒载体质粒DNA

pDON-AI-2 Neo DNA/pDON-AI-2 DNA (Code No. 3653/3654)

pMEI-5 Neo DNA/pMEI-5 DNA (Code No. 3655/3656)

TB Green, *TaKaRa Ex Taq* and RetroNectin are registered trademarks of Takara Bio Inc.

PrimeScript, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202204Da