

Code No. 6167

研究用

TaKaRa

Provirus Copy Number
Detection Primer Set, Human
(for Real Time PCR)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外必备材料	3
● 操作注意	3
● 操作方法	3
● 实验例	5
● 关联产品	6

● 制品说明

本制品是利用Real Time PCR方法对以MLV(murine leukemia Virus: 鼠白血病病毒)为基础的逆转录病毒(Retrovirus)载体向人体正常细胞^{*1}中导入基因时,测定前病毒拷贝数的试剂盒。前病毒(Provirus)是指逆转录病毒基因组整合至宿主DNA中的状态,此状态称为前病毒。

本制品与CycleavePCR™ Core Kit (Code No. CY501)组合使用,通过测定导入基因的人体正常细胞基因组DNA来测定前病毒拷贝数。另外,本制品扩增的区域为MLV的包装信号区,因此,可以测定大部分以MLV为基础的逆转录病毒载体导入人体正常细胞后的前病毒拷贝数。

传统的前病毒测定方法是把导入基因的宿主细胞克隆后,通过Southern blotting方法进行测定,计算出前病毒的平均拷贝数。计算平均拷贝数需要大量克隆进行Southern blotting,此方法耗时、费力。使用本制品不需要进行细胞的克隆即可简单地计算出前病毒的拷贝数。

与本制品组合使用的CycleavePCR Core Kit是采用Cycling探针法^{*2}进行Real Time PCR反应的专用试剂盒,具有检出特异性高的优势,能够抑制背景基因组DNA的影响,从而简单、准确地对目的基因进行定量分析。

* 1: 注意

本制品只能用于导入基因的人体细胞,不能用于其他细胞。另外,只限于正常细胞等2倍体的常染色体。癌细胞、培养细胞等不是2倍体常染色体细胞,请参照说明书推荐的方法使用。

病毒载体感染细胞后,马上使用本制品测定时,前病毒和整合前的双链DNA和环状DNA(2LTR.1LTR)也可能检出。请在感染数日后进行基因组DNA的提取和测定。从细胞中制备基因组DNA时,建议使用基因组DNA提取试剂盒如NucleoSpin Tissue等。

* 2: Cycling Probe法

本制品采用Cycling Probe法进行检测,Cycling Probe法(原理见下图1)是由RNA和DNA构成的杂合探针与RNase H组合使用的高灵敏度检出法,能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe内部含有RNA碱基,一端标记荧光淬灭物质,另一端标记荧光淬灭物质,当探针处于完整状态时,由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光,但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后,RNase H在RNA部分将探针切断,淬灭抑制作用解除,荧光物质发出荧光。通过测定荧光强度,能够实时监控扩增产物量。

如果探针的RNA部分与模板不匹配,RNase H就不能在RNA部分将探针切断,所以该检出方法是一种即使一个碱基不同也能识别的高特异性检出方法。

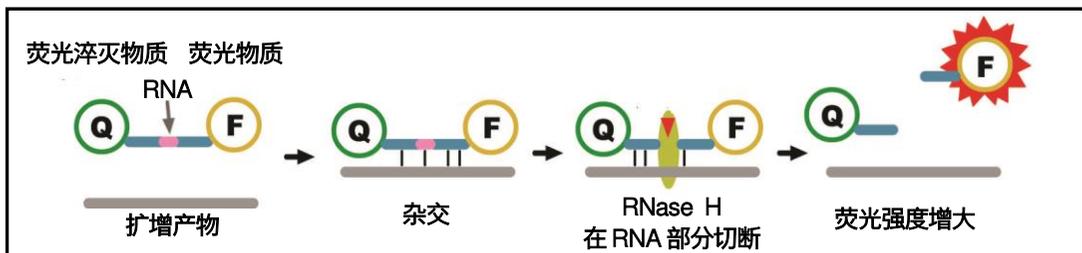
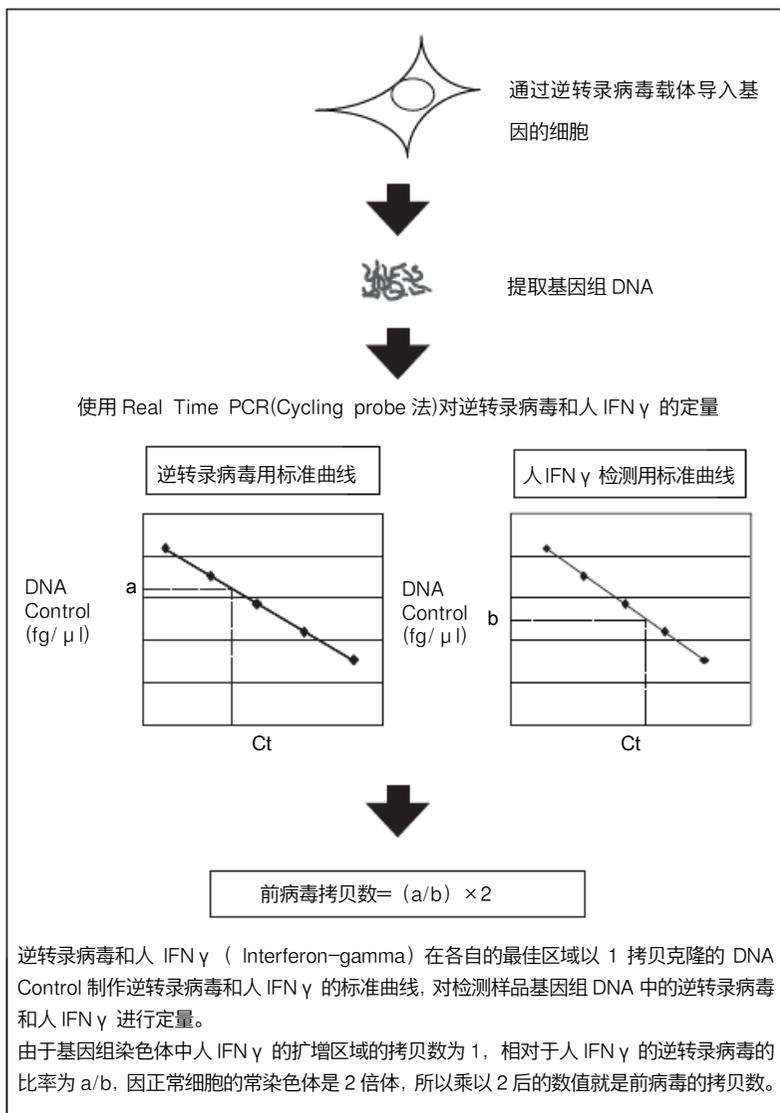


图 1: Cycling Probe 法原理

测定方法原理见下图。



● 制品内容 (100 次量; 25 μ l 反应体系)

- | | |
|--|-----------------|
| 1. Retrovirus Primer Mix for Provirus, Human (10 pmol/ μ l each) | 50 μ l |
| 2. Retrovirus Probe for Provirus, Human (10 pmol/ μ l) * | 50 μ l |
| 3. hIFN γ Primer Mix for Provirus (10 pmol/ μ l each) | 50 μ l |
| 4. hIFN γ Probe for Provirus (10 pmol/ μ l) * | 50 μ l |
| 5. DNA Control Template for Provirus, Human (200 pg/ μ l) | 15 μ l |
| 6. EASY Dilution (for Real Time PCR) | 1 ml \times 4 |

* : 荧光标记探针应避光保存

● 保存: -20°C 。

● 试剂盒外必备材料

CycleavePCR Core Kit (Code No. CY501)

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

- (1) 应先配制各种试剂的混合液，将 dH₂O、buffer、酶等配制成 Master Mix，可以减少试剂的损失及分装、混合的次数，使反应试剂体积更准确，防止实验结果之间产生误差。
- (2) 使用前将 CycleavePCR Core Kit (Code No. CY501) 中含有的 *TaKaRa Ex Taq* HS 和 *Tli RNase H II* 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℃ 中取出，使用后立即放入 -20℃ 保存。
- (3) CycleavePCR Core Kit (Code No. CY501) 中含有的 10× CycleavePCR Buffer 在保存过程中有时会产生沉淀物，溶解后不影响使用。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

1. 基因组 DNA 的制备

- 1) 从逆转录病毒载体导入基因的人体正常细胞中提取基因组 DNA。
- 2) 提取的基因组 DNA 用灭菌水稀释至 20–100 ng/μl，在新 Tube 中取所需要的量，95℃，热变性 5 分钟后冰上急冷。

*：使用 NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250) 可简单、快速地提取高纯度基因组 DNA。

2. 制作标准曲线用样品的制备

使用试剂盒中含有的 DNA Control Template for Provirus, Human 进行 Real Time PCR 反应后，制作逆转录病毒和人 IFN γ 的标准曲线，从两种标准曲线可以计算出前病毒的拷贝数。

按照以下步骤梯度稀释 DNA Control Template for Provirus, Human

- 1) 将 1 μl DNA Control Template for Provirus, Human (200 pg/μl) 加入到 99 μl EASY Dilution (for Real Time PCR) 中，100 倍稀释后调制成为 2 pg/μl (约 5.7×10^5 copies/μl) (Tube 1)。
- 2) 在新的 Tube 中分别加入 45 μl EASY Dilution (for Real Time PCR) (Tube 2~5)。
- 3) 将 Tube 1 充分混匀后，取 5 μl 2 pg/μl 的 DNA Control Template for Provirus 加入到 Tube 2 中，充分混合。
- 4) 从 Tube 2 中取 5 μl 加入到 Tube 3 中，充分混合。
- 5) 重复上述操作，梯度稀释至 Tube 5。

Tube	DNA 量 (μl)	EASY Dilution (μl)	浓度
1	1	99	2 pg/μl
2	5	45	200 fg/μl
3	5	45	20 fg/μl
4	5	45	2 fg/μl
5	5	45	0.2 fg/μl

- 6) 95℃热变性 5 分钟后冰上急冷。

3. Real Time PCR 反应液的配制

(请按照 CycleavePCR Core Kit 的说明书进行操作)

请按照下面组份配制逆转录病毒和人 IFN γ 的 PCR 反应液 (反应液的配制请在冰上进行) *1

(逆转录病毒反应体系) (1 个反应)

试剂	使用量	终浓度
10×CycleavePCR buffer ^{*2}	2.5 μl	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each) ^{*2}	3 μl	0.3 mM
Mg ²⁺ solution (25 mM) ^{*2}	5 μl	5 mM
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl) ^{*2}	0.25 μl	
Tli RNase H II (200 U/μl) ^{*2}	0.5 μl	
Retrovirus Primer Mix for Provirus, Human (10 pmol/μl each)	0.5 μl	0.2 μM each
Retrovirus Probe for Provirus, Human (10 pmol/μl)	0.5 μl	0.2 μM
基因组DNA或标准曲线用Sample	5 μl	
dH ₂ O ^{*2}	7.75 μl	
Total	25 μl	

(人 IFN γ 反应体系) (1 个反应)

试剂	使用量	终浓度
10×CycleavePCR buffer ^{*2}	2.5 μl	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each) ^{*2}	3 μl	0.3 mM
Mg ²⁺ solution (25 mM) ^{*2}	5 μl	5 mM
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl) ^{*2}	0.25 μl	
Tli RNase H II (200 U/μl) ^{*2}	0.5 μl	
hIFN γ Primer Mix for Provirus (10 pmol/μl each)	0.5 μl	0.2 μM each
hIFN γ Probe for Provirus (10 pmol/μl)	0.5 μl	0.2 μM
基因组DNA或标准曲线用Sample	5 μl	
dH ₂ O ^{*2}	7.75 μl	
Total	25 μl	

* 1: 使用 Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900) 时的反应体系。使用其它仪器时请参照各仪器的使用说明书。

* 2: CycleavePCR Core Kit (Code No. CY501) 中含有的组份。

4. 开始反应 (使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 的操作方法) *

将反应管或Plate在离心机上轻离心，放入Thermal Cycler Dice Real Time System //中后开始反应。在 Thermal Profile Setup 界面的 Collect Data 上选择 FAM。

Step	温度	时间	检出	
预变性	95°C	30秒	OFF	
PCR反应	变性	95°C	5秒	OFF
	退火	55°C	15秒	OFF
	延伸	72°C	15秒	ON
循环圈数	40 cycles			

5. 结果分析

反应结束后，在 FAM 通道确认扩增曲线，制作标准曲线后按照下面的计算方法可计算出被检测样品的前病毒拷贝数。

<前病毒拷贝数的计算方法>

利用前逆转录病毒用标准曲线和人IFN γ 用标准曲线可以计算出样品中的逆转录病毒和人IFN γ 的浓度。

前病毒拷贝数 = (样品的逆转录病毒浓度 / 样品的人 IFN γ 浓度) × 2*

* : 正常细胞的常染色体是 2 倍体，所以要乘以 2

6. 常染色体不是 2 倍体的样品前病毒拷贝数计算方法

本制品只测定染色体中以 1 拷贝数存在的人 IFN γ 区域，常染色体是 2 倍体时在计算式的最后乘以 2，常染色体不是 2 倍体时难以计算出正确的前病毒拷贝数。只要先明确染色体数，前病毒的拷贝数 = (样品的逆转录病毒浓度 / 样品的人 IFN γ 浓度) × 倍体数。

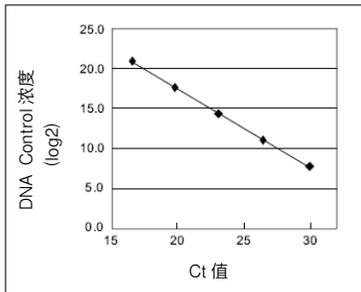
● 实验例

1. 方法

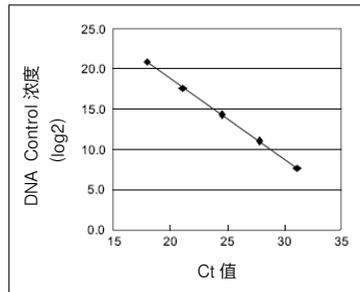
逆转录病毒载体导入基因的细胞（常染色体是 2 倍体的细胞）克隆后，利用 Southern blotting 方法进行前病毒拷贝数的测定，计算出前病毒的拷贝数，从获取的前病毒拷贝数为 1 copy/细胞~6 copy/细胞的细胞中提取基因组 DNA 后，利用制品对 100 ng 基因组 DNA 进行前病毒拷贝数的测定，并同 Southern blotting 方法进行了比较。

2. 结果

逆转录病毒用标准曲线和人 IFN γ 用标准曲线如下图 2 所示。



A



B

- A. 逆转录病毒用标准曲线
- B. 人 IFN γ 用标准曲线

图 2：使用本制品得到的标准曲线

表 1 分别使用本制品和 Southern blotting 法测定前病毒拷贝数的结果与比较。

使用本制品计算出的前病毒拷贝数	使用 Southern blotting 法测定的前病毒拷贝数
0	0
0.93	1
2.01	2
2.88	3
3.01	3
6.25	6

● 关联产品

CycleavePCR™ Core Kit (Code No. CY501)

Real Time PCR仪

Thermal Cycler Dice Real Time System (Code No. TP800)

8联Tube & Cap

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

高效率逆转录病毒载体用基因导入试剂

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

逆转录病毒制备用细胞G3T-hi 细胞 (Code No. 6163)

culture system using gas-permeable culture bags, CultiLife® Spin (Code No. KB630)

逆转录病毒载体制备Kit

Retrovirus Constructive System Eco/Ampho (Code No. 6164/6165)

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)

pDON-5 Neo DNA/pDON-5 DNA (Code No. 3657/3658)

siRNA表达用逆转录病毒载体质粒DNA

pSINsi-hH1 DNA/pSINsi-hU6 DNA/pSINsi-mU6 DNA (Code No. 3660/3661/3662)

逆转录病毒滴定度测定用试剂

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (Code No. 6166)

TaKaRa Ex Taq and RetroNectin are registered trademarks of Takara Bio Inc.

CycleavePCR 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.takara-bio.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: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201809Da