

# プロウイルスコピー数を迅速、簡単に測定！ レトロウイルスベクターによるヒト正常細胞への遺伝子導入時に活躍！

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

製品コード 6167 100 反応 ¥30,000

- サザンブロッティングは不要！リアルタイム PCR で簡便・迅速にプロウイルスコピー数を測定
- MLV ベースのレトロウイルスベクターほぼすべてに適応

レトロウイルスベクターは作製が容易で、増殖期にある多くの細胞種への遺伝子導入が可能です。さらに組換えヒトフィブロネクチンフラグメント (RetroNectin<sup>®</sup>) と併用すれば、造血幹細胞を始めとする各種幹細胞への遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができます。

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、細胞に感染後、組換えレトロウイルスの RNA から逆転写～合成された 2 本鎖 DNA が細胞ゲノム DNA に組み込まれてプロウイルス状態になり、細胞が分裂した後も娘細胞に受け継がれ、長期間にわたり安定的な遺伝子発現が可能となります。細胞ゲノム DNA に挿入されたプロウイルスのコピー数の測定は、マーカーを持たないレトロウイルスベクターの力価測定や陽性細胞のモニタリング、遺伝子コピー数と遺伝子発現量との関係の解析など、幅広く利用することができます。さらに、多重感染度の調節や遺伝子治療における安全性の評価への応用など、重要な解析用途に使用可能と考えられます。

プロウイルスコピー数は、遺伝子導入した細胞をクローニングして各クローンのゲノム DNA をサザンブロッティングすることによって測定できますが、細胞あたりの平均プロウイルスコピー数を算出するためには多くのクローンを取得してサザンブロッティングを行う必要があり、非常に労力を要します。

リアルタイム PCR を利用する Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR) なら、迅速かつ簡便にプロウイルスコピー数を測定することができます。MLV (murine leukemia virus : マウス白血病ウイルス) ベースのレトロウイルスベクターを用いてヒト正常細胞\*へ遺伝子導入を行った際の、プロウイルスコピー数の測定に用いるリアルタイム PCR 用プライマーとサイクリングプローブがセットになっています。

本稿では、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した細胞でのプロウイルスコピー数の測定例をご紹介します。

\*注意：本セットは遺伝子導入したヒト細胞用です。ヒト以外の細胞には使用できません。また、正常細胞など常染色体が 2 倍体のものに限ります。

### ■ 内容 (100 反応分; 25 $\mu$ l 反応系)

Retrovirus Primer Mix for Provirus (各 10 pmol/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
Retrovirus Probe for Provirus (10 pmol/ $\mu$ l) *1	50 $\mu$ l
hIFNg Primer Mix for Provirus, Human (各 10 pmol/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
hIFNg Probe for Provirus, Human (10 pmol/ $\mu$ l) *1	50 $\mu$ l
DNA Control Template for Provirus, Human (200 pg/ $\mu$ l)	15 $\mu$ l
EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml $\times$ 4

\*1 : サイクリングプローブ (FAM<sup>™</sup> 標識)

注意：本製品は、サイクリングプローブを用いてリアルタイム PCR を行うためのコアキットである CycleavePCR<sup>®</sup> Core Kit (製品コード CY501) と組み合わせて使用します。

### ■ 特徴

本セットには、MLV のパッケージングシグナルコード領域をターゲットとするプライマーおよびサイクリングプローブと、ヒトインターフェロン- $\gamma$  遺伝子 (hIFNg) をターゲットとするプライマーおよびサイクリングプローブが含まれます。

本セットと CycleavePCR<sup>®</sup> Core Kit を組み合わせて使用することで、レトロウイルスベクターにより遺伝子導入したヒト正常細胞のゲノム DNA を用いて迅速、簡単にプロウイルスコピー数を測定することができます。迅速性と定量性に優れたリアルタイム PCR 法と非常に特異性の高い検出法であるサイクリングプローブ法の組み合わせで、ゲノム DNA のバックグラウンドを抑えて正確かつ簡便にターゲットの定量を行うことができます。

[サイクリングプローブ法について]

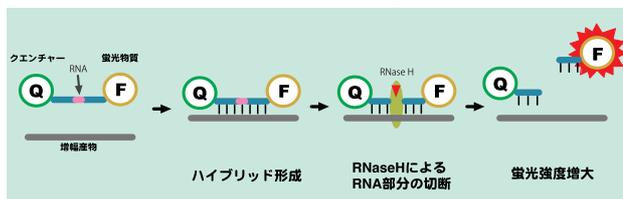


図 1 サイクリングプローブ法の検出原理

DNA と RNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度かつ特異的な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます (図 1)。プローブは、RNA 部を挟んで一方に蛍光物質が、他方にその蛍光物質の発する蛍光を消光する

物質(クエンチャー)が標識されています。このプローブはインタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後にRNase HによりRNA部分で切断されて、強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで増幅産物量をモニターすることができます。プローブのRNA部分がミスマッチであればRNase Hにより切断されることはないため、一塩基の違いも識別できる特異性の高い検出方法です。

### ■ プロウイルスコピー数測定方法の原理

図2に本セットを用いた測定原理を示します。レトロウイルスのパッケージングシグナルコード領域とhIFN $\gamma$ のそれぞれの最適領域が1コピークローニングされたDNA Control Template for Provirus, Humanを用いて、2種類の検量線(レトロウイルス用とhIFN $\gamma$ 用)を作成し、目的サンプルのゲノムDNA中のレトロウイルス(a)とhIFN $\gamma$ (b)の定量を行います。hIFN $\gamma$ はゲノムに1コピー存在するので、hIFN $\gamma$ に対するレトロウイルスの比率はa/bになり、常染色体が2倍体である正常細胞では、2を掛けた数字がプロウイルスコピー数となります。

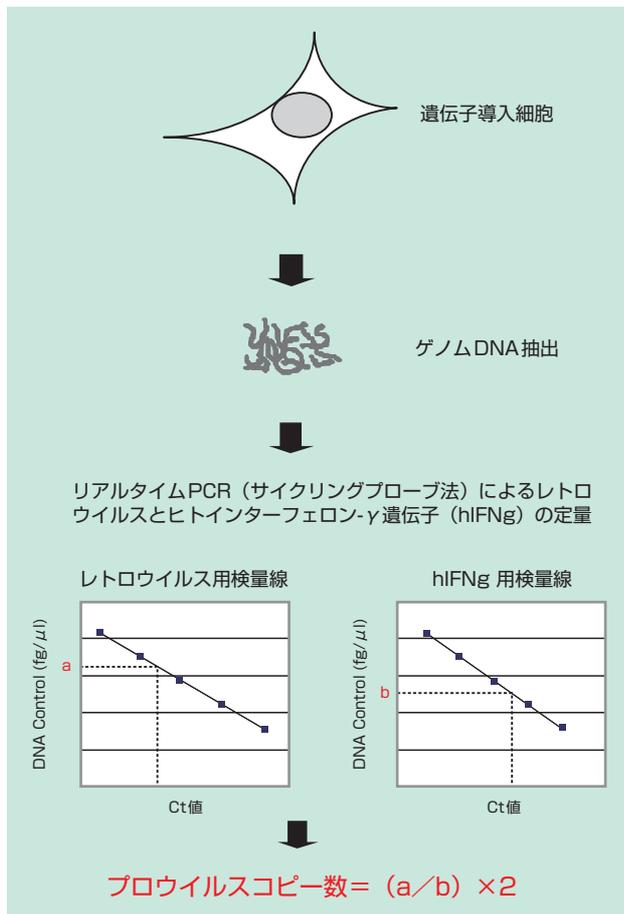


図2 本セットを用いたプロウイルスコピー数測定方法の原理

### ■ プロウイルスコピー数の測定(サザンブロッティングとの比較)

#### 【方法】

レトロウイルスベクターで遺伝子導入した細胞(常染色体2倍体細胞)をクローニングした。次にFastPure<sup>®</sup> DNA Kit(製品コード9191)を用いて各クローンからゲノムを抽出し、BamH Iで処理した後、サザンブロッティングでプロウイルスコピー数を測定した(図3)。プロウイルスコピー数が1~6コピー/細胞の5クローンを選択し、それぞれ100 ngのゲノムDNAと本セットを用いてプロウイルスコピー数を測定し(図4)、サザンブロッティングの結果と比較した(表1)。

#### 【結果】

表1に示すように、サザンブロッティングで測定したプロウイルスコピー数と本セットを用いて検出したコピー数は非常に良い相関を示します。本セットを用いて簡単、迅速にプロウイルスコピー数を測定できることが示されました。

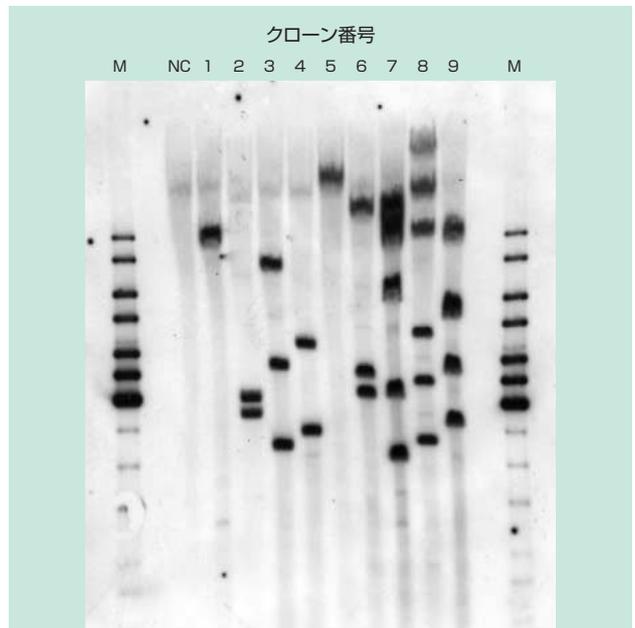


図3 遺伝子導入した細胞ゲノムDNAのサザンブロッティング結果

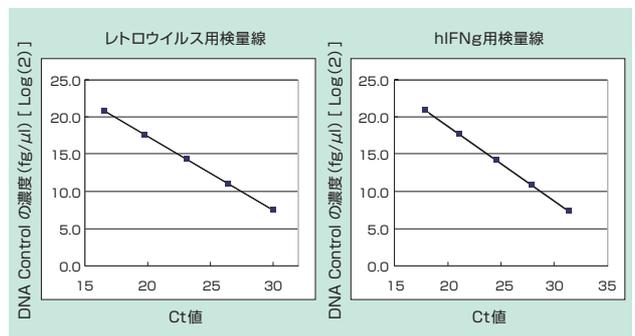


図4 本セットで得られた検量線

表 1 本セットを用いて算出したプロウイルスコピー数とサザンブロットングの結果との比較

クローン番号	本セットを用いて算出したプロウイルスコピー数	サザンブロットングで得られたプロウイルスコピー数
NC	0	0
1	0.93	1
3	2.88	3
4	2.01	2
6	3.01	3
8	6.25	6

NC : Negative Control

### ■ まとめ

レトロウイルスベクターは今では一般的な遺伝子導入ツールで、多くの関連製品を入手することができます。しかし、これまでプロウイルスコピー数を測定するキットは存在しませんでした。新発売の本プライマーセットとCycleleavePCR® Core Kitを用いることで、簡単かつ迅速にプロウイルスコピー数を測定することが可能になり、マーカーを持たないレトロウイルスベクターの力価測定や遺伝子導入細胞のモニタリングなど、これまでできなかった解析を行うことが可能になります。

### ■ 関連製品

#### サイクリングブローブ法コアキット

- CycleleavePCR® Core Kit  
製品コード CY501 50回 ¥15,000

#### リアルタイム PCR 装置

- Thermal Cycler Dice® Real Time System  
製品コード TP800 一式 ¥3,600,000

#### レトロウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入に!

- RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)  
製品コード T100A 0.5 mg ¥25,000  
製品コード T100B 2.5 mg ¥100,000

#### 一過性レトロウイルスベクター作製キット

- Retrovirus Constructive System Eco  
製品コード 6164 1 Set ¥120,000
- Retrovirus Constructive System Ampho  
製品コード 6165 1 Set ¥120,000

#### レトロウイルスベクタープラスミド DNA

- pDON-AI-2 Neo DNA  
製品コード 3653 20 µg ¥50,000
- pDON-AI-2 DNA  
製品コード 3654 20 µg ¥50,000
- pMEI-5 Neo DNA  
製品コード 3655 20 µg ¥50,000
- pMEI-5 DNA  
製品コード 3656 20 µg ¥50,000
- pDON-5 Neo DNA **NEW**  
製品コード 3657 20 µg ¥50,000
- pDON-5 DNA **NEW**  
製品コード 3658 20 µg ¥50,000

#### siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド DNA

- pSINsi-hH1 DNA  
製品コード 3660 20 µg ¥35,000
- pSINsi-hU6 DNA  
製品コード 3661 20 µg ¥35,000
- pSINsi-mU6 DNA  
製品コード 3662 20 µg ¥35,000

#### レトロウイルスベクター用 RNA タイター測定セット

- Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)  
製品コード 6166 100 反応分 ¥35,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は47ページをご覧ください。

[2](#) [3](#) [4](#) [10](#) [11](#) [18](#) [23](#) [25](#)