

製品コード 6196

研究用

TaKaRa

**LVpro™ Provirus
qPCR Quantitation Kit**

説明書

v202507Da

目次

I.	製品説明	3
II.	内容	5
III.	保存	5
IV.	本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）	6
V.	操作上の注意	7
VI.	操作	8
	VI-1. 検体サンプルの調製	8
	VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始	9
	VI-3. 解析	12
VII.	補足：エリア分けについて	13
VIII.	関連製品	13
IX.	注意	14

I. 製品説明

LVpro Provirus qPCR Quantitation Kitは、リアルタイムPCRを利用してレンチウイルス(LV)ベクターによりヒト細胞へ遺伝子導入した際のゲノムに組み込まれたベクターコピー数(プロウイルスコピー数)を測定するための製品です。本製品は、一般的に広く使用されているレンチウイルスベクターで遺伝子導入したヒト正常細胞のプロウイルスコピー数を測定することができます。

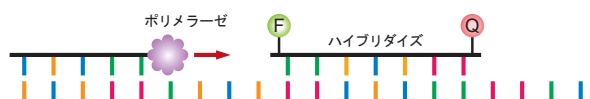
1. リアルタイム PCR 法 (プローブ法) の原理

本製品では、Probe qPCR Mix によるプローブ検出 (5'-ヌクレアーゼ法) によりターゲットを検出します。本製品には 5' 側に蛍光物質 (FAM/HEX)、3' 側にクエンチャー物質 (BHQ-1) を修飾したプローブを含みます。PCR 増幅中、プローブはそれぞれの標的遺伝子に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、耐熱性 DNA ポリメラーゼの持つ 5' → 3' エクソヌクレアーゼ活性により、テンプレートにハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出します。

1) 熱変性



2) プライマーのアニーリング/プローブのハイブリダイゼーション



3) 伸長反応

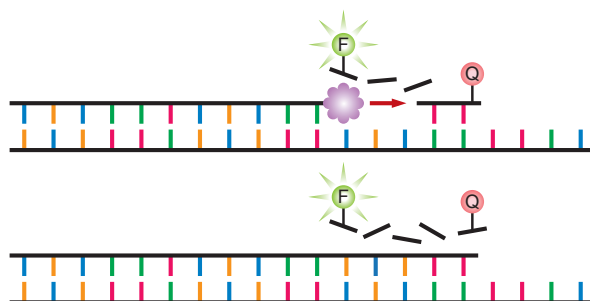


図 1. プローブ法の原理

2. プロウイルスコピー数測定法

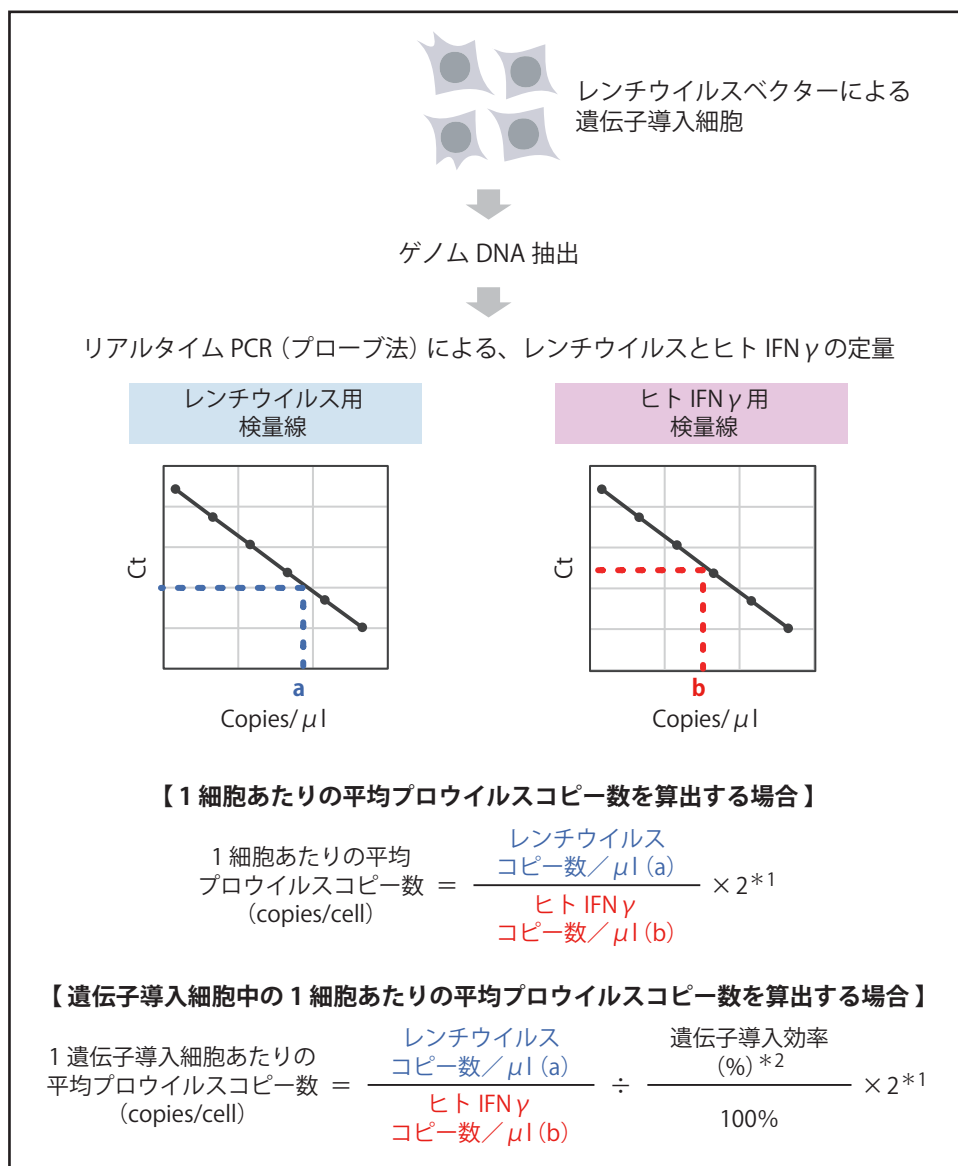


図 2. 本製品を用いたプロウイルスコピー数測定方法の原理

レンチウイルス配列とヒト IFN γ 配列の一部がそれぞれ 1 コピーずつ含まれる Provirus Control Template を用いて両者の検量線を作成し、目的サンプルのゲノム DNA 中のレンチウイルス (a) とヒト IFN γ (b) のコピー数 (copies/ μ l) を定量します。ヒト IFN γ はゲノム染色体に 1 コピー存在するため、ヒト IFN γ に対するレンチウイルスの比率は a/b になり、ヒトの常染色体は 2 倍体ですので、ヒト IFN γ に対するレンチウイルスベクターのコピー数の比 (a/b) に 2^{*1} を乗じることで、1 細胞あたりの平均プロウイルスコピー数を算出できます。

* 1: 宿主細胞が 2 倍体の場合は、「2」となります。細胞株を使用する場合は倍数性が異なる可能性があるため、必要に応じて設定してください。

* 2: 遺伝子導入効率は別途測定し、その値をもとに算出してください。

II. 内容 (100 回分、25 μ l 反応系)

○ Probe qPCR Mix, with UNG (2 $\times$ conc.) *1	625 μ l $\times$ 2
● Lentivirus Primer/Probe Mix for Provirus (10 $\times$ conc.)	250 μ l
● hIFN γ Primer/Probe Mix for Provirus (10 $\times$ conc.)	250 μ l
○ H ₂ O	1 ml
● ROX Reference Dye (50 $\times$ conc.) *2	200 μ l
● ROX Reference Dye II (50 $\times$ conc.) *2	200 μ l
● Provirus Control Template (4.13 $\times$ 10 ⁷ copies/ μ l) *3	25 μ l
EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml $\times$ 2

* 1 : 反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺、酵素等を含みます。
ウラシル-*N*-グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

* 2 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

- Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ 添加の必要がない機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)

- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)

- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社) など

* 3 : レンチウイルス配列およびヒト IFN γ 配列の増幅領域を含む Provirus Control Template です。他の試薬へのコンタミネーションに留意してください。

III. 保存

− 20℃

IV. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- DNA 抽出キット
細胞からゲノム DNA を抽出する場合は、NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10 / 50/.250）などをお勧めします。
- Recombinant DNase I (RNase-free)（製品コード 2270A）
レンチウイルス DNA の混入が疑われる場合、細胞からゲノム DNA を抽出する前に DNase I 処理を行うことを強く推奨します。
- Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)
細胞洗浄に使用します。

【器具】

- 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
- 専用反応チューブあるいはプレート

【機器】

- 微量高速遠心機
- ヒートブロック（DNase I 処理、ゲノム DNA 抽出に使用）
- リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC（製品コード TP970）
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)(Thermo Fisher Scientific 社)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社) など

V. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. Probe qPCR Mix, with UNG を使用する際には、泡立てないように穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。
2. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。
3. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
4. 万一、サンプルやプライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
5. 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃ (5 ～) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。
6. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (VII. 補足：エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物が入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本製品では反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
7. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

VI-1. 検体サンプルの調製

細胞からゲノム DNA (検体サンプル) を抽出します。

※ ゲノム DNA 抽出には、NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250) の使用を推奨します。

※ レンチウイルス DNA の混入が疑われる場合、ゲノム DNA 抽出前に DNase I 処理を行ってください。

A-1. DNase I 処理する場合

検体の細胞数は $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells を推奨します。ここでは、Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A) を用いた検体サンプルの調製方法を以下に示します。

1. 以下の DNase I Mixture を調製する。

調製後はピペティングにより混合し、スピンドウンする。

[1 反応分の DNase I Mixture]

試薬	使用量
10 × DNase I Buffer	2 μ l
Recombinant DNase I (RNase-free) (5 U/ μ l)	2 μ l
D-PBS	16 μ l
Total	20 μ l

2. $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells の細胞を 1.5 ml マイクロチューブに分取し、 $1,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清を注意深く取り除く。
3. D-PBS を 1,000 μ l 添加後、 $1,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清を注意深く取り除く。
4. DNase I Mixture 20 μ l を 3. に加え、混和後 37°C で 30 分間反応する。
注：反応時間を短くするとレンチウイルス DNA が残留する可能性があります。
5. D-PBS を 1,000 μ l 添加後、 $1,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清を注意深く取り除く。
6. 5. (D-PBS による洗浄) を再度繰り返す。
7. 上清を取り除いた細胞ペレットからゲノム DNA を抽出する (セクション B へ進む)。

A-2. DNase I 処理しない場合

レンチウイルス DNA の混入の可能性がない細胞に関しては、DNase I 処理をスキップすることが可能です。

1. $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells の細胞を 1.5 ml マイクロチューブに分取し、 $1,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清を注意深く取り除く。
2. D-PBS を 1,000 μ l 添加後、 $1,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清を注意深く取り除く。
3. 上清を取り除いた細胞ペレットからゲノム DNA を抽出する (セクション B へ進む)。

B. NucleoSpin Tissue を用いたゲノム DNA の抽出

NucleoSpin Tissue などの DNA 抽出キットを用いて細胞からゲノム DNA を抽出してください。操作方法は各キットの取扱説明書に従ってください。

なお、NucleoSpin Tissue を使用する場合は、以下の点に注意してください。

- Lysis Buffer T1 を添加した後は、細胞ペレットをしっかりと崩すようにピペッティングを行ってください。なお、細胞数が多い場合は溶液に強い粘性が生じることがあるため、操作時には十分注意してください。
- Lysis Buffer B3 を添加すると、白色のもや状の沈殿が一時的に発生することがあります。これは正常な反応であり、もやが消失するまでピペッティングを繰り返して、溶液が均一になるようにしてください。
- 加熱処理による細胞溶解後も、細胞塊などの沈殿が残る場合があります。その際は、サンプルを $11,000 \times g$ で 5 分間遠心し、得られた上清を新しいマイクロチューブに移してください。
- 溶出した DNA 溶液は 4°C で、長期保存の場合は -20°C で保存してください。

VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

1. 検体サンプルを希釈する。

$10 \sim 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (推奨 $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$) になるように、抽出した検体サンプルを滅菌精製水で希釈する。

2. サンプルを 95°C で 5 分間熱変性した後、 4°C で 5 分以上急冷する。^{*1}

3. 検量線用のスタンダードサンプルを調製する。

- 1) 以下に従ってそれぞれのチューブに EASY Dilution (for Real Time PCR) を $45 \mu\text{l}$ ずつ分注する。

[1]	$4.13 \times 10^6 \text{ copies}/\mu\text{l}$ (Provirus Control Template 原液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)
[2]	$4.13 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ([1] の $4.13 \times 10^6 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)
[3]	$4.13 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ([2] の $4.13 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)
[4]	$4.13 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ([3] の $4.13 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)
[5]	$4.13 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ([4] の $4.13 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)
[6]	$4.13 \times 10 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ([5] の $4.13 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$)

- 2) Provirus Control Template ($4.13 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{l}$) を $5 \mu\text{l}$ 分取し、[1] のチューブに加え、1 秒ずつ 5 回ボルテックスして十分に混和し、スピンドウンする。
- 3) 以降、2) の操作を順次繰り返し、希釈系列とする。
- 4) 希釈したスタンダードを 95°C で 5 分間熱変性した後、 4°C で 5 分以上急冷する。^{*1}

^{*1}：氷上にて急冷することも可能です。この熱変性ステップを省略すると結果に影響を及ぼす可能性がありますので、必ず熱変性するようにしてください。

4. リアルタイム PCR 反応液を調製する。

必要数 + α 分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブまたはプレートに 20 μ l ずつ分注する。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*2】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μ l
● Lentivirus Primer/Probe Mix for Provirus (FAM)	2.5 μ l
● hIFNg Primer/Probe Mix for Provirus (HEX)	2.5 μ l
⊕ H ₂ O	2.5 μ l
Total	20.0 μ l

* 2 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社) など

【ROX Reference Dye を使用する場合*3】

Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合、ROX Reference Dye を使用してください。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μ l
● Lentivirus Primer/Probe Mix for Provirus (FAM)	2.5 μ l
● hIFNg Primer/Probe Mix for Provirus (HEX)	2.5 μ l
● ROX Reference Dye or ● Dye II	0.5 μ l
⊕ H ₂ O	2.0 μ l
Total	20.0 μ l

* 3 : 対象機種

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

- Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

5. 鑄型を添加する。

4. で分注した PCR 反応液に 1～3. で調製した検体サンプルまたはスタンダードサンプルを 5 μ l 添加し、しっかりふたをする。陰性コントロールには ⊕ H₂O を 5 μ l 添加し、しっかりとふたをする。その後、反応チューブをスピンドウンし、リアルタイム PCR 装置にセットする。

6. 以下の条件で反応を実施する。

※ リアルタイム PCR 装置の操作方法は、それぞれの装置の取扱説明書をご参照ください。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III/IV、QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用する場合は、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

< Hold >

(25℃ 10 分)*4

95℃ 30 秒

< PCR : 40 サイクル >

95℃ 5 秒

60℃ 30 秒 (蛍光検出 : FAM/HEX (VIC))

* 4 : PCR によるコンタミネーションが疑われる場合には、(25℃ 10 分) のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

【検出対象と蛍光検出フィルター】

検出対象	蛍光検出フィルター
レンチウイルス	FAM
ヒト IFN γ	HEX (VIC)

VI-3. 解析

PCR 反応後、使用するリアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照し、Ct 値（または Cq 値）を取得します。Ct 値の算出には大きく 2 通りの方法があり、Crossing Point 法（CP 法）と 2nd Derivative Maximum 法（SDM 法）があります。CP 法とは増幅曲線と閾値（Threshold）の交点から Ct 値を求める方法です。SDM 法は、増幅曲線の二次導関数（2 回微分した曲線）が最大となる位置を Ct 値とする方法です。後者の方法では、閾値の設定により Ct 値が変動することがなく、装置の検出誤差の影響も受けませんので、精度の高い解析が可能です。以上の理由から本製品では SDM 法で Ct 値を算出することを推奨します。ただし、装置によっては Crossing Point 法、2nd Derivative Maximum 法の選択ができないものもありますので、ご注意ください。

1 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、以下の手順で解析してください。

1. スタンダードサンプルからレンチウイルス検出系およびヒト IFN γ 検出系にて測定された Ct 値と copies/ μ l の常用対数（log₁₀）を用いて、標準曲線を作成する。

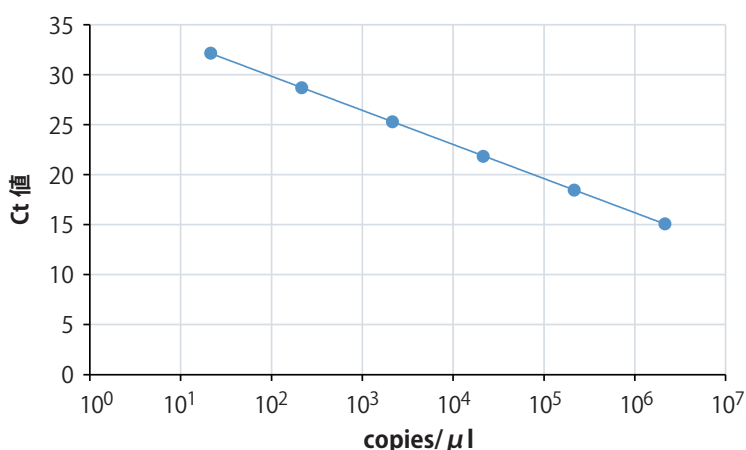


図 3. Provirus Control Template を用いた標準曲線の例

2. 1. の標準曲線により、各検体サンプルの Ct 値からレンチウイルスおよびヒト IFN γ の copies/ μ l を求める。
3. 以下の数式により 1 細胞あたりの平均プロウイルスコピー数を算出する。

【1 細胞あたりの平均プロウイルスコピー数を算出する場合】

$$\text{1 細胞あたりの平均プロウイルスコピー数 (copies/cell)} = \frac{\text{レンチウイルスコピー数} / \mu\text{l}}{\text{ヒト IFN}\gamma \text{ コピー数} / \mu\text{l}} \times 2^{*5}$$

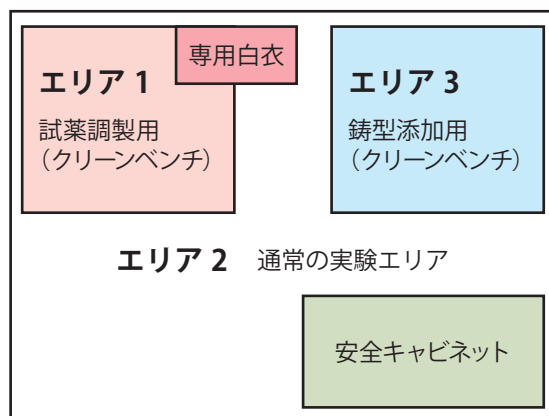
【遺伝子導入細胞中の 1 細胞あたりの平均プロウイルスコピー数を算出する場合】

$$\text{1 遺伝子導入細胞あたりの平均プロウイルスコピー数 (copies/cell)} = \frac{\text{レンチウイルスコピー数} / \mu\text{l}}{\text{ヒト IFN}\gamma \text{ コピー数} / \mu\text{l}} \div \frac{\text{遺伝子導入効率 (\%)}^{*6}}{100\%} \times 2^{*5}$$

* 5：宿主細胞が 2 倍体の場合「2」となります。細胞株を使用する場合は倍数性が異なる可能性があるため、必要に応じて設定してください。

* 6：遺伝子導入効率は別途測定し、その値をもとに算出してください。

VII. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
スタンダードサンプルの希釈もここで行う。

VIII. 関連製品

[レンチウイルスベクタープラスミド]

pLVpro2-Promoterless-Km Vector (製品コード 6977)
pLVpro2-MND-Km Vector (製品コード 6978)
pLVpro2-EF1 α -Km Vector (製品コード 6979)
pLVpro2-EFS-Km Vector (製品コード 6980)
pLVpro2-MSCV-Km Vector (製品コード 6981)

[Packaging Mix]

LVpro™ Packaging Mix (製品コード 6195)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV Vector) (製品コード 6962)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI Vector) (製品コード 6963)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-EF1 α Vector) (製品コード 6964)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector) (製品コード 6965)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector) (製品コード 6966)
LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector) (製品コード 6967)

[力価測定]

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235)
Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200)
Lenti-X™ GoStix™ Plus (製品コード 631280/631281)

IX. 注意

- ・ 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- ・ 本製品はレンチウイルスベクターを含むものではなく、また本製品の使用によりレンチウイルスベクターが産生されるものではありません。しかしながら、本製品の使用対象であるレンチウイルスベクターの使用には文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号）にある P2 レベル以上の施設が必要です。
- ・ レンチウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清は、挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えウイルスの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。吸入や付着を防ぐために必ず、安全キャビネットを使用してください。
- ・ 本製品の使用はすべて研究用に限定されています。臨床目的での使用および生体外診断に使用することはできません。
- ・ 本製品ご利用の際は省令および組織内の組換え DNA 実験安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- ・ 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。LVpro はタカラバイオ株式会社の、Lenti-X、GoStix は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社