

Code No. 6196

研究用

TAKARA

LVpro™ Provirus
qPCR Quantitation Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	3
● 保 存	3
● 试剂盒外所需主要试剂、器具及仪器	3
● 操作注意	4
● 操作方法	4
(一)样品制备	4
(二)Real Time PCR 反应液的配制与反应启动	5
(三)数据分析	7
● 补充：关于区域划分	8
● 关联产品	8

● 制品说明

LVpro Provirus qPCR Quantitation Kit 是利用 Real Time PCR 技术，检测使用慢病毒载体向人细胞导入基因时整合到基因组中的载体拷贝数（前病毒拷贝数）的制品。本制品可测定使用市面上广泛使用的慢病毒载体进行基因导入的人正常细胞的前病毒拷贝数。

1. Real Time PCR 法（探针法）原理

本制品通过 Probe qPCR Mix 的探针检测（5' 核酸酶法）识别目标序列。试剂盒包含 5' 端修饰荧光基团（FAM/HEX）、3' 端修饰淬灭基团（BHQ-1）的探针。PCR 扩增时，探针与靶基因特异性杂交，此时荧光信号被淬灭抑制。延伸反应中，耐热 DNA 聚合酶的 5' → 3' 核酸外切酶活性分解与模板杂交的探针，解除淬灭释放荧光信号。

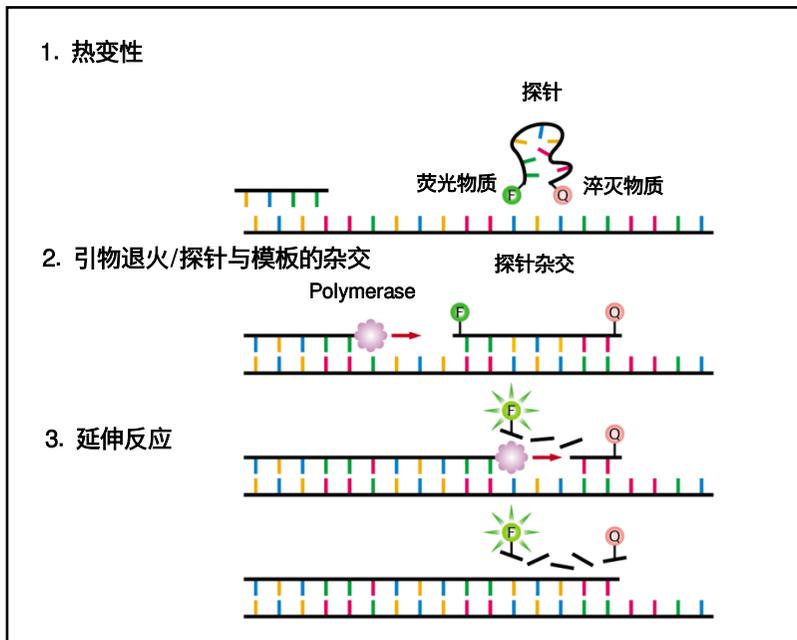


图 1. 探针法原理

2. 前病毒拷贝数测定方法

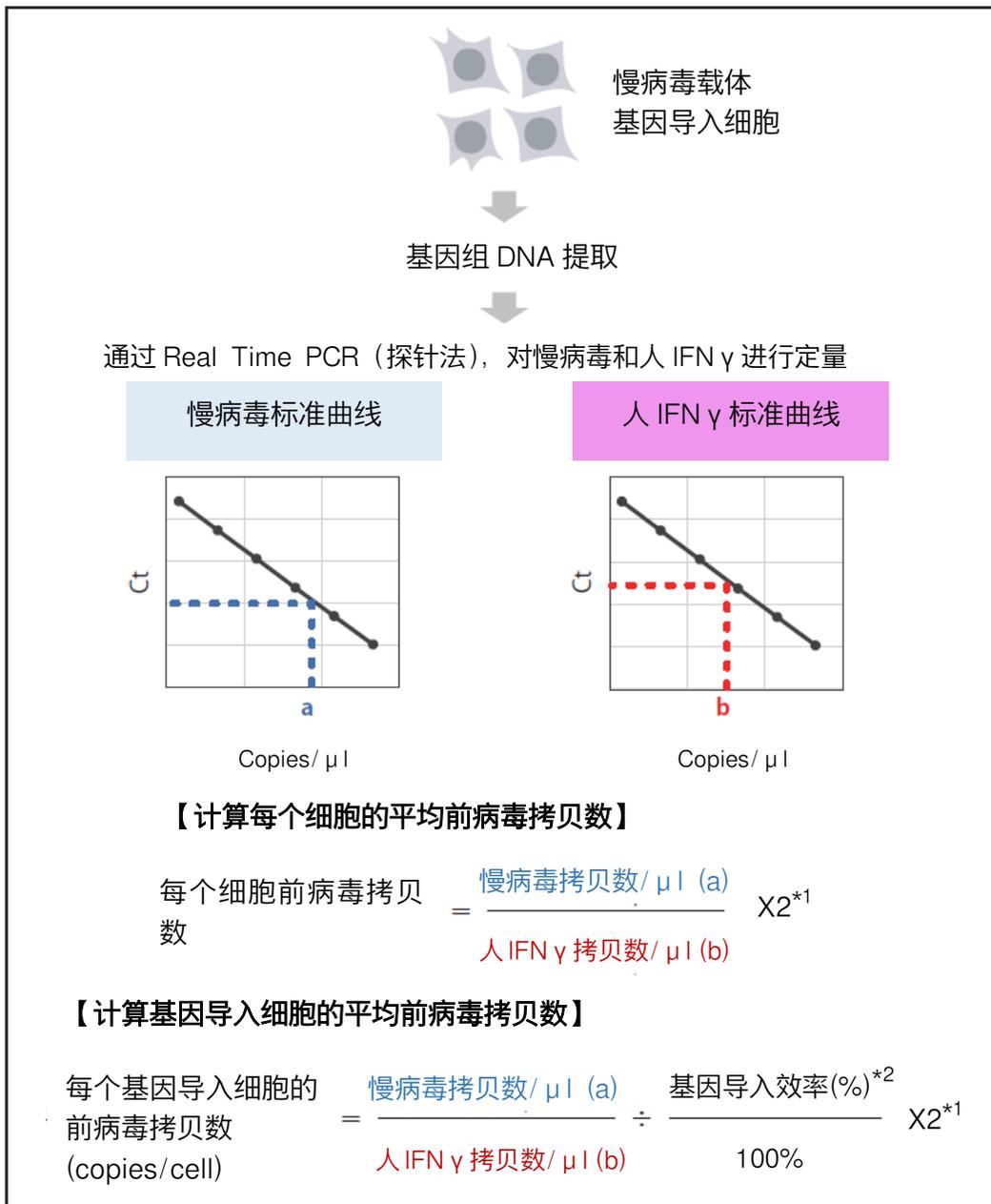


图 2. 使用本制品测定前病毒拷贝数的原理

使用包含单拷贝慢病毒序列和人 IFN γ 序列的 Provirus Control Template 制作标准曲线, 对目的样品的基因组 DNA 中的慢病毒(a)和人 IFN γ (b) 的拷贝数 (copies/ μ l) 进行定量。因人 IFN γ 在基因组中为单拷贝, 慢病毒与人 IFN γ 的拷贝数比值为 a/b。人类常染色体为二倍体, 将该比值(a/b)乘以 2^{*1}, 即可计算每个细胞的平均前病毒拷贝数。

*1: 宿主细胞为二倍体时取“2”。所使用细胞株时不同, 倍数可能不同, 请根据实际情况设定。

*2: 基因导入效率需单独测定后计算。

● 制品内容 (100 次量, 25 μ l 反应体系)

	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	
	hIFNg 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: 含有反应所需的dNTP Mixture、Mg²⁺、酶等成分。反应体系中添加尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG), 可防止PCR扩增产物污染导致的假阳性。

*2: 用在Applied Biosystems的Real Time PCR扩增仪上, 用以校正孔与孔之间的荧光信号误差。

◆ 使用 ROX Reference Dye 的 PCR 仪

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

◆ 使用 ROX Reference Dye II 的 PCR 仪

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

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

◆ 无需添加的机型

– Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV with PC (Code No. TP1010)

– Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (Code No. TP970)

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

– LightCycler 96 System (Roche Diagnostics) 等

*3: 含慢病毒和人IFN γ 扩增区域, 需严防污染其他试剂。

● 保 存

-20°C

● 试剂盒外所需主要试剂、器具及仪器

【试剂】

· DNA 提取试剂盒

当从细胞中提取基因组 DNA 时, 建议使用 NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250)等。

· Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A)

如果怀疑慢病毒 DNA 污染, 强烈建议在从细胞中提取基因组 DNA 之前进行 DNase I 处理。

· Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)

用于细胞清洗。

【器具】

· 微量移液器 (200 μ l/20 μ l/10 μ l)

· 带滤芯枪头

· 专用反应管/板

【仪器】

- 微量高速离心机
 - 加热块（用于 DNase I 处理和基因组 DNA 提取）
 - Real Time PCR 扩增仪
- Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC (Code No. TP1010)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (Code No. TP970)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 ml block)(Thermo Fisher Scientific)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics) 等

● 操作注意

使用本产品时的注意事项，使用前请务必阅读。

1. 使用 Probe qPCR Mix, with UNG 时需轻柔颠倒混匀，避免产生气泡。混匀不充分将降低反应效率，请勿涡旋振荡混匀。另外，如果在保存过程中出现沉淀，请用手轻轻加热或在室温中放置一段时间后，然后轻柔颠倒混匀至完全溶解。请务必混合均匀后再使用。
2. 溶解后的试剂请立即放在冰上。
3. 进行试剂分装时，请务必使用新的一次性新枪头，防止样品之间的交叉污染。
4. 如果样品或引物因混入核酸分解酶（核酸酶）而被分解，则无法准确检测。由于操作者汗液/唾液可能引入核酸酶导致样本降解，需全程佩戴一次性手套和口罩。
5. 本产品采用抗 *Taq* 抗体的热启动 PCR 酶，切勿进行化学修饰型热启动酶所需的 95°C，5–15 分钟活化步骤。过量热处理会降低酶活性，影响扩增效率。模板初始变性 95°C，30 秒即可。
6. 从制备反应液到添加样品，建议划分三个物理隔离区域操作（参考“补充：关于区域划分”部分）。请避免在任何区域打开和关闭含有扩增产物的管盖。
区域 1：配制/分装反应液
区域 2：制备样本
区域 3：向反应液添加样本
本产品无需对扩增产物进行电泳分析，请勿取出产物以防实验室核酸污染。
7. 使用 Real Time PCR 仪时，请按照仪器说明书进行操作。如果分析软件的校正功能不正确，可能会导致错误判断。如有必要，请按照实时 PCR 设备的说明手册进行分析参数的手动设置。

● 操作方法

（一）样品制备

从细胞中提取基因组 DNA（样品）。

※ 推荐使用 NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250) 进行基因组 DNA 提取。

※ 如果怀疑有慢病毒 DNA 污染，请在提取基因组 DNA 前进行 DNase I 处理。

A-1 进行 DNase I 处理的情况

推荐样品细胞数为 1×10^6 至 5×10^6 个细胞。以下介绍使用 Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A) 制备样品的方法。

1) 配制以下 DNase I Mixture。

配制后通过吹打混匀，并进行瞬时离心。

[1 个反应的 DNase I Mixture]

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

- 2) 将 1×10^6 至 5×10^6 个细胞分装到 1.5 ml 微量离心管中，在 $1,000 \times g$ 下离心 2 分钟，小心去除上清液。
- 3) 加入 1,000 μl D-PBS，在 $1,000 \times g$ 下离心 2 分钟，小心去除上清液。
- 4) 向步骤 3 的沉淀中加入 20 μl DNase I Mixture，混匀后在 37°C 反应 30 分钟。
注：缩短反应时间可能导致慢病毒 DNA 残留。
- 5) 加入 1,000 μl D-PBS，在 $1,000 \times g$ 下离心 2 分钟，小心去除上清液。
- 6) 重复步骤 5 (D-PBS 清洗) 一次。
- 7) 从去除上清液后的细胞沉淀中提取基因组 DNA (进入 B 部分)。

A-2 不进行 DNase I 处理的情况

对于不可能存在慢病毒 DNA 污染的细胞，可以跳过 DNase I 处理步骤。

- 1) 将 1×10^6 至 5×10^6 个细胞分装到 1.5 ml 微量离心管中，在 $1,000 \times g$ 下离心 2 分钟，小心去除上清液。
- 2) 加入 1,000 μl D-PBS，在 $1,000 \times g$ 下离心 2 分钟，小心去除上清液。
- 3) 从去除上清液后的细胞沉淀中提取基因组 DNA (继续 B 部分)。

B 使用 NucleoSpin Tissue 提取基因组 DNA

请使用 NucleoSpin Tissue 等 DNA 提取试剂盒从细胞中提取基因组 DNA。操作方法请参照各试剂盒的使用说明书。

使用 NucleoSpin Tissue 时，请注意以下几点：

- 加入 Lysis Buffer T1 后，请充分吹打以彻底重悬细胞沉淀。注意，细胞数量多时，溶液可能产生强粘性，操作时请务必小心。
- 加入 Lysis Buffer B3 后，有时会暂时出现白色絮状沉淀。此为正常反应，请反复吹打直至絮状物消失，使溶液均匀。
- 热处理过的细胞裂解后，可能仍有细胞团块等沉淀残留。此时，请将样品在 $11,000 \times g$ 下离心 5 分钟，将所得上清液转移到新的微量离心管中。
- 洗脱的 DNA 溶液可在 4°C 保存；如需长期保存，请在 -20°C 保存。

(二) Real Time PCR 反应液的配制与反应启动

1. 稀释样品。

用无菌纯化水稀释提取的样品，使其浓度达到 $10 \sim 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (推荐 $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$)。

2. 将样品在 95°C 热变性 5 分钟后，在 4°C 急冷至少 5 分钟。*1

3. 配制标准曲线用标准品。

1) 按照以下说明，向各管中分别分装 45 μl EASY Dilution (for Real Time PCR)。

- | |
|--|
| [1] 4.13×10^6 copies/μl (Provirus Control Template 原液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |
| [2] 4.13×10^5 copies/μl ([1]的 4.13×10^6 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |
| [3] 4.13×10^4 copies/μl ([2]的 4.13×10^5 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |
| [4] 4.13×10^3 copies/μl ([3]的 4.13×10^4 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |
| [5] 4.13×10^2 copies/μl ([4]的 4.13×10^3 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |
| [6] 4.13×10 copies/μl ([5]的 4.13×10^2 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl) |

- 2) 分取 5 μl Provirus Control Template (4.13×10^7 copies/ μl), 加入[1]管中, 涡旋振荡 5 次, 每次 1 秒, 充分混匀, 瞬时离心。
- 3) 随后依次重复步骤 2)的操作, 进行系列稀释。
- 4) 将稀释好的标准品在 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 5 分钟后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 急冷至少 5 分钟。^{*1}
*1: 也可在冰上急冷。省略此热变性步骤可能会影响结果, 请务必进行热变性。

4. 配制 Real Time PCR 反应液。

配制所需反应数+ α 份的反应液, 然后 Real Time PCR 管或板中各分注 20 μl 。

【不使用 ROX Reference Dye 的情况^{*2}】

[1 个反应的反应液]

试剂	使用量
○ Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μl
● Lentivirus Primer/Probe Mix for Provirus (FAM)	2.5 μl
● hIFNg Primer/Probe Mix for Provirus (HEX)	2.5 μl
○ H ₂ O	2.5 μl
Total	20 μl

*2: 适用机型:

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC (Code No. TP1010)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (Code No. TP970)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics) 等

【使用 ROX Reference Dye 的情况^{*3}】

在使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪等需要校正孔间荧光信号的仪器进行分析时, 请使用 ROX Reference Dye。

[1 个反应的反应液]

试剂	使用量
○ Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μl
● Lentivirus Primer/Probe Mix for Provirus (FAM)	2.5 μl
● hIFNg Primer/Probe Mix for Provirus (HEX)	2.5 μl
● ROX Reference Dye or ● Dye II	0.5 μl
○ H ₂ O	2.0 μl
Total	20 μl

*3: 适用机型:

◆ 使用 ROX Reference Dye 的 PCR 仪

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

◆ 使用 ROX Reference Dye II 的 PCR 仪

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

5. 添加模板。

向步骤 4 分装好的 PCR 反应液中加入 5 μl 步骤 1~3 中制备的样品或标准品, 盖紧盖子。阴性对照中加入 5 μl H₂O, 盖紧盖子。随后, 将反应管瞬时离心, 放入 Real Time PCR 仪中。

6. 在以下条件下进行反应。

※ Real Time PCR 仪的操作方法, 请参照各仪器的使用说明书。

※ 使用 Thermal Cycler Dice Real Time System III/IV 或 QuantStudio 5 Real-Time PCR

System 时, 请将 Run mode / Ramp speed 设置为 Fast。

<预变性 (Hold) >

(25°C 10 min) *4

95°C 30 sec

<PCR: 40 cycles >

95°C 5 sec

60°C 30 sec (荧光检测: FAM/HEX (VIC))

*4: 如果怀疑有 PCR 污染, 请进行 (25°C 10 min) 的步骤。通过 UNG 的作用可降解 PCR 产物清除污染。

【检测对象与荧光检测滤光片】

检测对象	荧光检测滤光片
慢病毒	FAM
人 IFN γ	HEX (VIC)

(三) 数据分析

PCR 反应后, 参照所使用的 Real Time PCR 仪的使用说明书获取 Ct 值 (或 Cq 值)。

Ct 值的计算方法主要有两种: Crossing Point 法 (CP 法) 和 2nd Derivative Maximum 法 (SDM 法)。CP 法是通过扩增曲线与阈值 (Threshold) 的交点来确定 Ct 值的方法。SDM 法是将扩增曲线的二阶导数 (二次微分曲线) 达到最大值的位置作为 Ct 值的方法。后一种方法不会因阈值设定而导致 Ct 值波动, 也不受仪器检测误差的影响, 因此可以进行高精度的分析。

基于以上原因, 本制品推荐使用 SDM 法计算 Ct 值。但请注意, 部分仪器可能无法选择 Crossing Point 法或 2nd Derivative Maximum 法。

为计算每个细胞的平均前病毒拷贝数, 请按以下步骤进行分析。

1. 使用标准品在慢病毒检测体系和人 IFN γ 检测体系中测得的 Ct 值以及 copies/ μ l 的常用对数 (log10) 制作标准曲线。

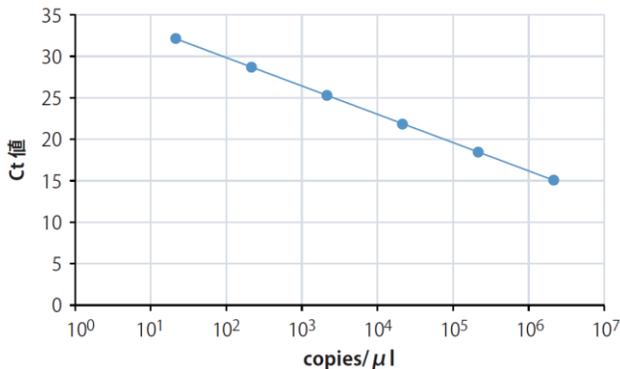


图 3. 使用 Provirus Control Template 的标准曲线示例

2. 利用步骤 1 的标准曲线, 根据各样品测得的 Ct 值, 计算出慢病毒和人 IFN γ 的 copies/ μ l。
3. 使用以下公式计算每个细胞的平均前病毒拷贝数。

【计算每个细胞的平均前病毒拷贝数时】

$$\begin{aligned} \text{每个细胞的平均} \\ \text{前病毒拷贝数} \\ \text{(copies/cell)} \end{aligned} = \frac{\text{慢病毒拷贝数/}\mu\text{l}}{\text{人 IFN } \gamma \text{ 拷贝数/}\mu\text{l}} \times 2^{*5}$$

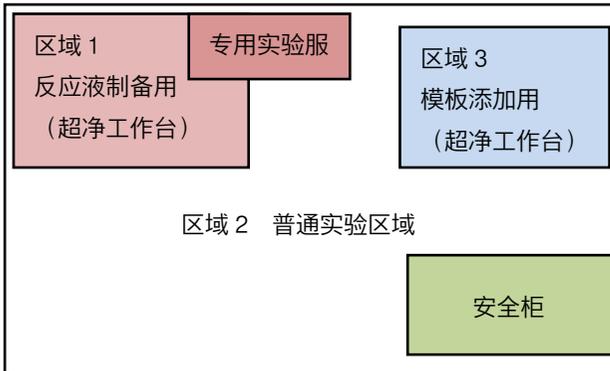
【计算基因导入细胞中每个细胞的平均前病毒拷贝数时】

$$\frac{\text{每个基因导入细胞的平均前病毒拷贝数 (copies/cell)}}{\text{慢病毒拷贝数/}\mu\text{l}} = \frac{\text{慢病毒拷贝数/}\mu\text{l}}{\text{人IFN}\gamma\text{拷贝数/}\mu\text{l}} \div \frac{\text{基因导入效率(\%)}^{*6}}{100\%} \times 2^{*5}$$

* 5: 宿主细胞为二倍体时取“2”。所使用细胞株不同倍数可能不同, 请根据需要设定。

* 6: 基因导入效率需另行测定, 并基于该值进行计算。

● 补充: 关于区域划分



区域 1: 只进行反应试剂、Real Time PCR 反应液的配制及分装 (无模板操作区)。

区域 2: 普通实验区域
进行样品处理及 DNA 制备。
根据需要设置安全柜。

区域 3: 高浓度 DNA 操作区域
在分装完成的反应液中添加模板 DNA, 标准品的稀释也在此区域进行。

● 关联产品

[慢病毒载体质粒]

pLVpro2-Promoterless-Km Vector (Code No. 6977)

pLVpro2-MND-Km Vector (Code No. 6978)

pLVpro2-EF1 α -Km Vector (Code No. 6979)

pLVpro2-EFS-Km Vector (Code No. 6980)

pLVpro2-MSCV-Km Vector (Code No. 6981)

[Packaging Mix]

LVpro™ Packaging Mix (Code No. 6195)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV Vector) (Code No. 6962)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI Vector) (Code No. 6963)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-EF1 α Vector) (Code No. 6964)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector) (Code No. 6965)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector) (Code No. 6966)

LVpro™ Packaging Mix (pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector) (Code No. 6967)

[滴度测定]

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit (Code No. 631235)

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Code No. 632200)

Lenti-X™ GoStix™ Plus (Code No. 631280/631281)

Thermal Cycler Dice and LVpro are trademarks of Takara Bio Inc.
Lenti-X and GoStix are trademarks of Takara Bio USA, 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、了解并遵守此声明的所有限制性条款是您的责任。

本文件由宝日生物技术（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>