

Virus Bank SOP-MFG-002

PCR 法による MFG レトロウイルスベクター感染細胞 (ψ CRIP シリーズ) の組換え遺伝子検出法に関する 標準操作手順書

1. 目的

- 1.1 本標準操作手順書は PCR 法による MFG ベクター感染細胞中の、目的の組換え遺伝子の検出について述べたものである。
- 1.2 本試験で用いる MFG ベクター感染細胞の調製は _____ の記載に従う。
- 1.3 本試験で用いる MFG ベクター感染細胞ゲノム DNA の調製は **Virus Bank SOP-MFG-001** の記載に従う。

2. 原理

- 2.1 MFG レトロウイルスベクターは Murine Moloney Leukemia Virus (MMLV) から改造されたものであり、細胞株 ψ CRIP によりパッケージングされる。野生ウイルスの env の部分に存在する *Xba* I、あるいは *Nco* I 切断部位と *Bam*HI 切断部位の間に外来 DNA が組み込まれている。これらの制限酵素切断部位の上流と下流に両側にプライマーを設定し、外来 DNA を PCR で増幅して、特異的に検出する。

3. 試薬類

- 3.1 滅菌水、10×Ex Taq Buffer、dNTP mixture、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)、Mineral oil (Sigma)

4. PCR プライマーの調製

- 4.1 インサート DNA 増幅用の primer #12: 5'-CTTCTCTAGGCGCCCATATG-3'、primer #13: 5'-GCCTGGACCACTGATATCCT-3'は、それぞれ滅菌精製水に終濃度 10 μ M となるように溶解する。

5. 操作手順 (操作はすべて手袋をして、氷冷にて行う)

5.1 1 回目の PCR 反応液の組成

滅菌水	34.75 μ l
10 x Buffer	5 μ l
DNTP mixture	4 μ l
Primer #12	2 μ l
Primer #13	2 μ l
細胞ゲノム DNA (0.1 μ g)	2 μ l
TaKaRa Ex Taq	0.25 μ l
	<hr/>
	50 μ l

25 μ l の mineral oil で反応液の上を覆って、最高速で 2 秒間遠心する。

5.2 PCR サーマルサイクラーのプログラム

合計 25 サイクル

95°C、3 分間 → 95°C、30 秒間 → 58°C、30 秒間 → 74°C、30 秒間 (目的のバンドによって異なる。目安として、30 秒/1000base) → 74°C、5 分間 → 4°C、forever

5.3 PCR 終了後の PCR 産物の検出はアガロースゲル電気泳動により実施する。泳動ゲルは以下の通り調製する。即ち、ミリ Q 水で希釈した 1×TAE Buffer に懸濁したアガロース (1%、w/v) を電子レンジ等により加熱し、完全にアガロースが溶解したのを確認し、室温で固まらない程度まで冷却する。Mupid-2 ゲルメーカーセット (アドバンス、#EM-2) にアガロースを流し込む。大プレート (W 107×L 60 mm) の場合 35 ml、小プレート (W 52×L 60 mm) の場合は 18 ml 使用する。コーム (アドバンス、#COMB25、大プレート 25 ウェル、小プレート 12 ウェル) をセットしアガロースが固まるまで放置する。PCR 産物 5 μl に 6×Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol) を 1 μl 添加し、そのうちの 5 μl をゲルにアプライして 1×TAE バッファー中、100 V で 30 分間泳動する。

5.4 終濃度 2 μg/ml のエチジウムブロマイドを添加したミリ Q 水に電気泳動後のゲルを浸し、室温で 5 分間放置する。その後、水道水で 5 分間洗浄する。UV (312 nm) 照射により、デンストグラフ (アトー、AE-6920M-03 型) にライブ画像を取り込んだ後、PICT ファイルとして保存する。バンドのサイズはインサートの長さプラス 382 bases になる。

5.5 測定例を以下に示す。

