Кот. #WK552S

Для исследовательских целей

TaKaRa

LymphoONE® Т-клеточная экспансия, без ксеногенных компонентов, средний объем, флакон 1 л

Руководство по эксплуатации изделия

RUO - только для исследовательских целей

v202506

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оглавление

I. Описание.....3

II. Компоненты.....3

III. Хранение.....3

IV. Способ применения.....3

V. Применение: Культивирование и расширение популяции Т-клеток с помощью ретронектина

Костимуляция.....4

VI. Ссылки.....8

VII. Сопутствующие товары.....8

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

I. Описание

Среда LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium подходит для культивирования Т-лимфоцитов человека и генной трансдукции в Т-лимфоциты с использованием ретровирусных и лентивирусных векторов. Среда не содержит белков или факторов роста, кроме человеческого сывороточного альбумина (фармацевтического качества) и рекомбинантного человеческого инсулина. По сравнению с нашим предыдущим продуктом, культуральной средой GT-T551 (кат. № WK551S), этот продукт улучшает скорость пролиферации Т-клеток без сыворотки или плазмы за счет оптимизации компонентов среды.
Для всех партий среды LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium проводятся различные тесты, такие как тесты на стерильность, микоплазму, эндотоксин и пролиферацию лимфоцитов и т. д. Кроме того, подтверждено, что значения pH и осмотического давления находятся в пределах ожидаемых диапазонов.
Поскольку в культивировании Т-клеток в качестве исходного материала стали использовать мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделение Т-клеток специально не требуется. МКПК доступны в продаже и могут быть получены из периферической крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности и т. д.

II. Компоненты

LymphoONE Т-клеточная экспансия, без ксеногенных компонентов, среда, бутылка 1 л.	1000 мл

III. Хранение

4°C, общий срок годности составляет 12 месяцев

IV. Способ применения

Среда LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium содержит человеческий сывороточный альбумин, человеческий инсулин, L-глутамин и стрептомицин; поэтому ее можно использовать непосредственно для культивирования Т-клеток. Среду LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium можно использовать для культивирования Т-клеток без добавления сыворотки или плазмы. Однако в некоторых случаях скорость пролиферации клеток увеличивается при добавлении сыворотки и плазмы.
Т-клетки можно размножать путем культивирования в среде LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium с цитокинами (IL-2 или IL-15 и т. д.) после стимуляции моноклональными антителами против CD3.[1-3]Пролиферацию Т-клеток можно усилить при стимуляции Т-клеток реагентом RetroNectin® с антителами к CD3. Кроме того, пролиферирующая популяция клеток содержит больше наивных Т-клеток по сравнению с однократной стимуляцией антителами к CD3.[4-8]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

V. Применение: Культивирование для расширения популяции Т-клеток путем костимуляции ретронектином.

Для увеличения количества Т-клеток проводили культивирование с помощью костимуляции ретронектином, используя ксено-свободную среду для расширения популяции Т-клеток LymphoONE и газопроницаемый культуральный мешок.

Примечание: Вам необходимо заключить лицензионное соглашение с Компания Takara Bio Inc., когда вы проводите культивирование Т-клеток с использованием реагента RetroNectin в целях, отличных от исследовательских.

[Метод]

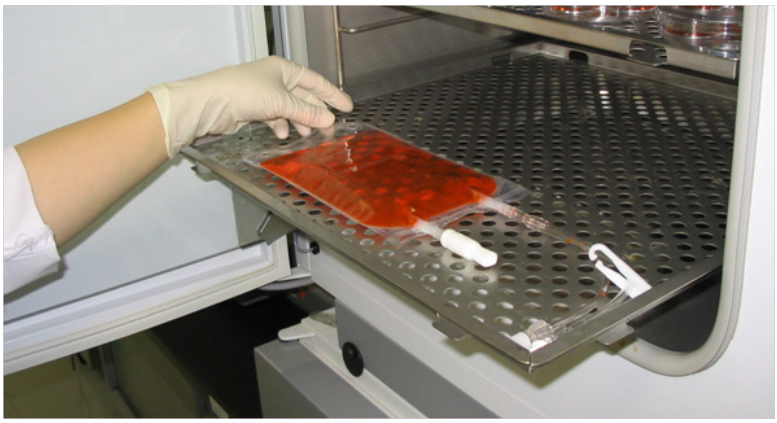
1) Покрытие культурального пакета CultiLife™215 (кат. № FU0005) моноклональными антителами против CD3 (кат. № T210) и реагентом RetroNectin (кат. № T100A/B, T202) (Подготовка, День 0)

1. Приготовьте 30 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего моноклональное антитело Anti-CD3mAb (5 мкг/мл) и реагент RetroNectin (25 мкг/мл).
2. Поместите весь объем в пакет CultiLife 215Culturebag.
3. Покройте культуральный пакет, инкубируя его при температуре 37°C и 5% CO_2,в течение 2-5 часов.
4. Вылейте весь раствор из пакета.
5. Промойте пакет 30 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) 3 раза.

Примечание: Перед посевом PBMCs удалите остатки PBS.

2) Посев периферических мононуклеарных клеток (День 0)

1. Подвесьте примерно 3x10_7PBMC в 30-50 мл среды для расширения клеточной популяции LymphoONET-Cell Expansion Xeno-Free Medium, содержащей 0-1% человеческой сыворотки или плазмы.
2. Добавьте весь объем суспензии PBMC в покрытый культуральный пакет CultureLife 215 (см. Метод-1 выше).
3. Добавьте в пакет среду для расширения популяции Т-клеток LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium с 0–1% человеческой сыворотки или плазмы до тех пор, пока объем жидкости не достигнет 200–300 мл. Затем добавьте ИЛ-2 до конечной концентрации 200–1000 Ед/мл.
4. Культивирование в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2,в течение четырех дней.



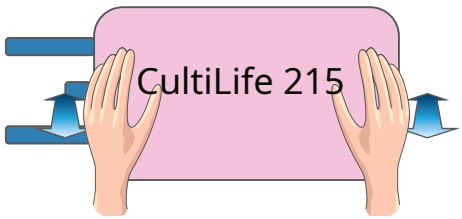
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3) Субкультура (День 4)

1. Соберите клетки из культурального пакета CultiLife 215, используя следующий метод, и перенесите их в новый культуральный пакет GT-T610 (CultiLife Eva) (кат. № FU0010).

[Метод суспензии клеток]

Клетки, культивируемые в пакете, покрытом RetroNectin, будут прочно прилипать к внутренней поверхности пакета. Возьмите пакет обеими руками и покачивайте его вперед-назад примерно 50 раз, чтобы клетки оказались в суспензии в культуральной среде, как показано на рисунке ниже.



2. Используйте микроскоп, чтобы убедиться, что в культуральном пакете CultiLife 215 практически не осталось клеток.

Примечание: Если в пакете остались клетки, можно добавить в него необходимое количество питательной среды и собрать их тем же способом, что и выше.

3. Добавьте соответствующее количество среды LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium и ИЛ-2 (до конечной концентрации 200–1000 на 1 мл культуральной среды).

Примечание: На этом этапе вы можете увеличить количество культуральных пакетов GT-T610 по мере необходимости (см. Таблицу 1). Максимальная вместимость культурального пакета GT-T610 составляет 1000 мл.

4. Продолжите культивирование клеток в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2. Примечание:

Инкубировать в течение 10–14 дней, соответствующим образом разбавляя клетки по мере увеличения их количества (см. Таблицу 1).

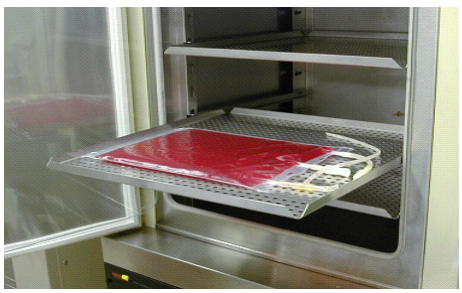
4) Сбор клеток (с 10 по 14 день)

1. Суспендируйте клетки, встряхивая среду в культуральном пакете GT-T610 20-30 раз, как в методе 3, описанном выше.

2. Соберите клеточную суспензию из пакета.

3. Промойте клетки центрифугированием или с помощью соответствующего оборудования для очистки клеток.

Примечание: Для использования в качестве чистящего раствора подходит фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 0,1% человеческого сывороточного альбумина, или физиологический раствор.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1. Примерные спецификации культуры.

	День 0	День 4	День 7	День 10
Клетка число	3 x 10_7клетки			
Середина объем	300 мл	500 мл x 5*3	1000 мл x 5*4	
Культура область	215 см2 *1	640 см2 *2x 5		
	CultiLife 215 x 1	GT-T610 x 5		сбор клеток

* 1 Площадь культивирования в мешке для культивирования CultiLife 215 составляет 215 $см^2$.2.

* 2 Площадь культивирования в мешке для культивирования aGT-T610 (CultiLife Eva) составляет 640 $см^2$.2.

* 3 Когда концентрация клеток меньше 4 x 10_5На 4-й день проведите культивирование до концентрации клеток более 5 x 10^6/мл. На 4-й день проведите субкультивирование до концентрации клеток более 5 x 10^6.4клеток/мл.

* 4 На этом этапе следует провести субкультивирование, чтобы концентрация клеток достигла более чем 5 x 10^6.5клеток/мл.

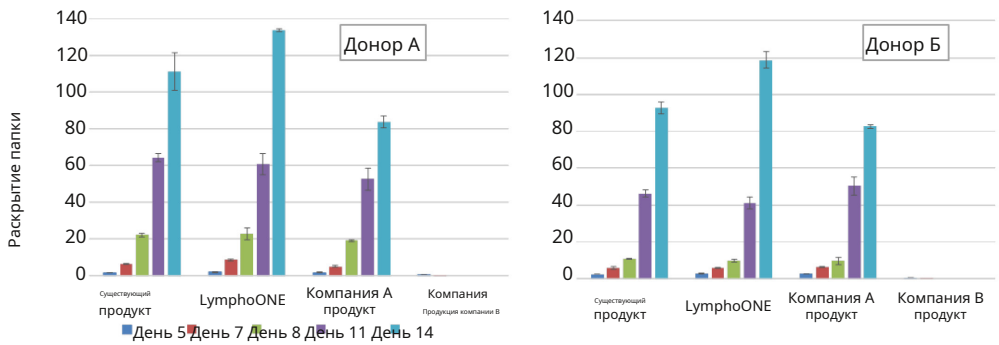
[Сравнение питательных сред в культуре для размножения Т-лимфоцитов]

Метод

Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) и плазма крови были выделены из крови, собранной у двух здоровых доноров, от которых было получено информированное согласие.

Клетки PBMC культивировали в течение 4 дней в условиях стимуляции в культуральном мешке CultiLife215 с моноклональным антителом Anti-CD3mAb, а затем дополнительно культивировали в течение 10 дней, соответствующим образом разбавляя клетки культуральной средой для лимфоцитов с добавлением IL-2.

Результаты



Среда для расширения популяции Т-клеток LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium продемонстрировала высокую скорость расширения даже без сыворотки (сыворотки человека группы AB), и было подтверждено, что среда LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium обладает лучшими показателями пролиферации, чем предыдущий продукт и продукты конкурентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

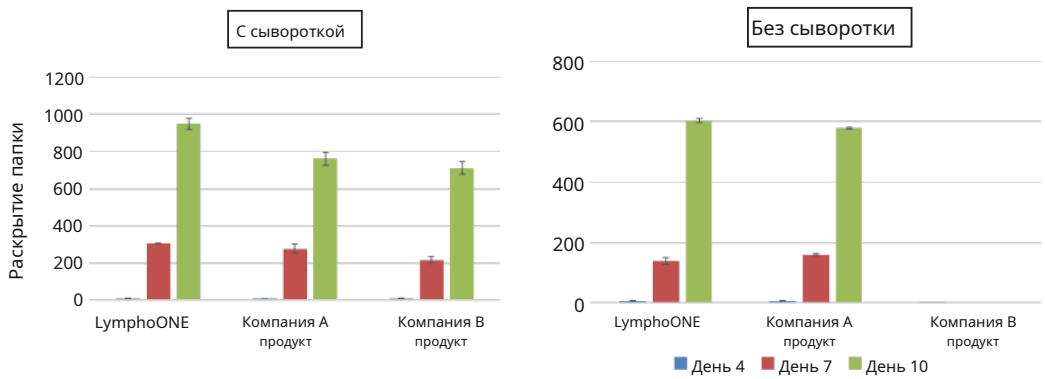
[Культивирование Т-клеток путем костимуляции ретронектином]

Метод

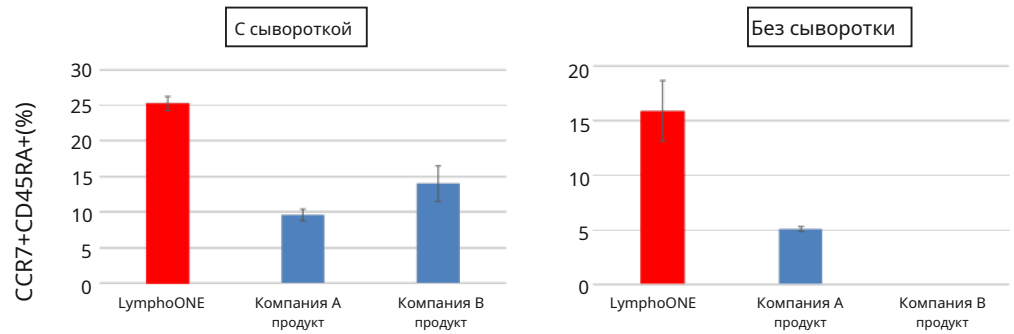
Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) культивировали в условиях костимуляции с помощью RetroNectin в культуральном пакете CultiLife215 с антителами к CD3 в течение 4 дней. Затем их культивировали в различных средах для культивирования лимфоцитов с ИЛ-2 в течение 10 дней, с сывороткой и без нее (сыворотка крови человека группы AB). Сыворотку добавляли в количестве 1% с 0 по 7 день, а затем в количестве 0,5% с 7 по 10 день.

Результаты

Скорость распространения культуры



соотношение наивных Т-клеток



Высокая скорость размножения клеток наблюдалась при использовании среды LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium даже без сыворотки (сыворотки человека группы AB). Было подтверждено, что популяция клеток, культивируемая в этой среде, содержала большое количество наивных Т-клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

VI. Список литературы

1) Ван, Ю.*и др.*Клетки CIK, полученные от пациентов с рецидивирующим или рефрактерным острым миелоидным лейкозом, могут быть эффективно размножены in vitro и использованы для уменьшения количества лейкемических бластов in vivo. *Эксфемтотол*(2013)**41**(3): 241-252.

2) Ай, ЮК*и др.*Клинические эффекты вакцин на основе дендритных клеток в сочетании с цитокин-индуцированными клетками-киллерами, вводимыми внутрибрюшинно пациентам со злокачественным асцитом.*Int J ClinExpMed*(2014)**7**(11): 4272-4281.

3) Додо, К.*и др.*Эффективный крупномасштабный метод ретровирусной трансдукции, включающий предварительную загрузку вектора в пакет, покрытый RetroNectin, с последующим низкотемпературным перемешиванием.*PLoSONE*(2014)**9**(1): e86275.

4) Ю, СС*и др.*. Персистенция in vivo генетически модифицированных Т-клеток, полученных ex vivo с использованием метода стимуляции фибронектином CH296. *Генная терапия рака*(2008)**15**(8): 508-516.

5) Исикава, Т.*и др.*Клинические испытания I фазы терапии Т-клетками, стимулированными фибронектином CH296, у пациентов с запущенным раком.*PLoSONE*(2014)**9**(1): e83786.

6) Хосои, Х.*и др.*Стимуляция через очень поздние антигены-4 и -5 улучшает многофункциональность и формирование памяти CD8.+Т-клетки. *Eur J Immunol* (2014)**44**(6): 1747-1758.

7) Сакамото, Н.*и др.*Клинические испытания I фазы аутологичной терапии NK-клетками с использованием нового метода экспансии у пациентов с запущенным раком пищеварительной системы. *J TranslMed*(2015)**13**: 277.

8) Ли, В.*и др.*Эффективность терапии с использованием цитокин-индуцированных киллерных клеток, активированных ретронектином, у пациентов с метастатическими опухолями головного мозга.*Онкол Рес Лечеб*(2015)**38**(4): 160-165.

VII. Сопутствующие товары

RetroNectin® (рекомбинантный фрагмент человеческого фибронектина) (кат. № T100A/B) RetroNectin® GMPgrade (кат. № T202)
RetroNectin®Pro (рекомбинантный фрагмент человеческого фибронектина) (кат. № T101A/B) Анти-CD3 моноклональное антитело GMP-класса (кат. № T210)
CultiLife™215Мешок для культур (Кат. № FU0005) GT-T610
(CultiLife™Eva) Мешок для культур (Кат. № FU0010)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

LymphoONE и RetroNectina являются зарегистрированными товарными знаками компании Takara Bio Inc. CultiLife является товарным знаком компании Takara Bio Inc.

ПРИМЕЧАНИЕ :Данный продукт предназначен исключительно для исследовательских целей. Он не предназначен для использования в терапевтических или диагностических целях. Данная продукция предназначена для применения у людей и животных. Также не используйте этот продукт в качестве пищевого, косметического или бытового средства и т.д.

Продукция компании Takara не может быть перепродана или передана, модифицирована для перепродажи или передачи, а также использована для производства коммерческой продукции без письменного разрешения компании Takara Bio Inc.

Если вам требуются лицензии для других целей, пожалуйста, свяжитесь с нами через наш веб-сайт по адресу www.takarabio.com.

Использование вами данного продукта также зависит от соблюдения любых применимых лицензионных требований, описанных на веб-странице продукта. Вы несете ответственность за ознакомление, понимание и соблюдение любых ограничений, установленных такими положениями.

Все товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев. Некоторые товарные знаки могут быть не зарегистрированы во всех юрисдикциях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кат. # T100A/B

Для использования в исследованиях

TaKaRa

RetroNectin®

(Фрагмент рекомбинантного фибронектина человека)

Инструкция по использованию

RUO - только для
исследовательских целей

v201705

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оглавление

I. Описание..... 3

II. Компоненты 4

III. Хранение..... 4

IV. Необходимые, но не предоставленные материалы 4

V. Протокол..... 5

1. Подготовка пластин с покрытием RetroNectin.....5

2. Генная трансдукция 6

A. Способ инфицирования ретронектин-связанным вирусом (RBV) 6

B. Метод инфицирования супернатантом (SN).....8

VI. Использованная литература..... 9

VII. Сопутствующие товары 10

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

I. Описание

Реагент RetroNectin представляет собой фрагмент рекомбинантного фибронектина человека (rFN-CH-296), состоящий из трех функциональных доменов: клеточно-связывающего домена (C-домен), гепарин-связывающего домена (H-домен) и последовательности CS-1. Фрагмент усиливает опосредованную ретровирусами трансдукцию генов, способствуя совместной локализации клеток-мишеней и вирионов. В частности, вирусные частицы связывают ретронектиновый реагент посредством взаимодействия с H-доменом, а клетки-мишени связываются главным образом посредством взаимодействия интегринового рецептора клеточной поверхности VLA-5 и VLA-4 с C-доменом фибронектина и сайтом CS-1 соответственно.
Способствуя близкому расположению, реагент RetroNectin может усиливать опосредованный ретровирусами перенос генов в клетки-мишени, экспрессирующие интегриновые рецепторы VLA-4 и/или VLA-5.*1

Существует два протокола инфицирования, опосредованного ретронектином: метод инфицирования супернатантом (SN) и метод инфицирования ретронектин-связанным вирусом (RBV).[5],*2 В методе заражения SN клетки смешивают с супернатантом вируса и загружают на планшет, покрытый ретронектином. В методе RBV ретровирус сначала связывают с планшетом, покрытым ретронектином, и клетки добавляют после удаления супернатанта ретровируса. Удаление супернатанта снижает количество ингибирующих молекул (например, молекул, секретируемых клетками-продуцентами, таких как протеогликаны и/или белки вирусной оболочки), которые могут снижать эффективность опосредованной вирусом трансдукции генов.

* 1 RetroNectin может также усиливать перенос генов, опосредованный лентивирусами.

* 2 Оба метода могут быть использованы для эффективной трансдукции генов. Хотя метод инфицирования RBV широко применим, может потребоваться некоторая модификация в зависимости от клеток-мишеней, векторов и/или генов-мишеней.

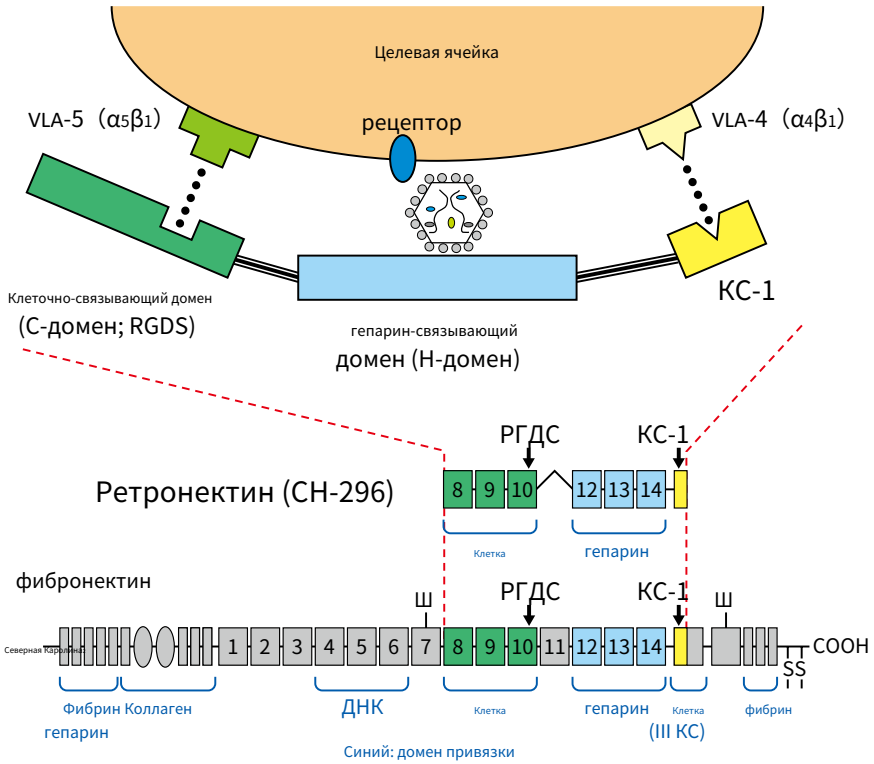


Рисунок 1. Гипотетический механизм ретронектин-опосредованной трансдукции. Клетка связывается с сайтом CS-1 через VLA-4 и с C-доменом через VLA-5. Вирусная частица может связываться с H-доменом ретронектина. Эти взаимодействия увеличивают локальные концентрации клеток и вирусных частиц, эффект, который, как считается, усиливает трансдукцию генов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

II. Компоненты

Ретронектин (фрагмент рекомбинантного фибронектина человека)	0,5 мг (кат. № T100A)
Ретронектин (фрагмент рекомбинантного фибронектина человека)	2,5 мг (кат. № T100B)

RetroNectin предоставляется в виде стерильного раствора 1 мг/мл.

[Форма] Стерильный раствор, содержащий 12,5 мМ цитрата натрия (pH 6,2) и 1,25% сахарозы.

III. Хранение

- 20 ℃, общий срок годности составляет 36 месяцев

Осторожно: Замораживание и оттаивание можно повторять до 10 раз.

Не перемешивайте раствор энергично. Не вортексировать.

IV. Необходимые, но не предоставленные материалы

[Оборудование]

- Планшеты или чашки для необработанных культур тканей
- Электрическая пипетка
- Дозаторы
- Стерильные пипетки
- Стерильные наконечники с фильтрами
- Безопасный шкаф или чистая рабочая станция
- Микроскоп
- CO2инкубатор
- Центрифуга для микропланшетов

[Реагенты]

- Стерильный PBS (-)
- HBSS/Hepes (сбалансированный солевой раствор Хэнка с добавлением 2,5% (об./об.) 1M Hepes) · 2% бычий сывороточный альбумин (BSAFractionV)/раствор PBS

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

V. Протокол

【 1. Подготовка планшетов, покрытых ретронектином 】

Покройте пластину 20–100 мкг/мл RetroNectin с объемом, соответствующим 4–20 мкг/см2 площади.

(1) Перед нанесением покрытия приготовьте раствор RetroNectin (20–100 мкг/мл*).1) путем разбавления стерильным PBS.

* 1 Пример: расчет количества реагента RetroNectin
Когда 2,25 мл раствора RetroNectin в концентрации 20 мкг/мл помещают в чашку диаметром 35 мм (9 см2), концентрация, используемая для покрытия, составляет 5 мкг/см2.

Примечание: Во избежание потери фрагмента RetroNectin не стерилизуйте раствор RetroNectin, разбавленный PBS, фильтрацией.

(2) Дозируйте соответствующий объем*2стерильного раствора RetroNectin в каждый планшет и дайте планшету постоять в течение 2 часов при комнатной температуре или при 4 °C в течение ночи.

* 2 Внесите по 0,5 мл в каждую лунку 24-луночного планшета или по 2 мл в каждую лунку 6-луночного планшета.

Примечание: На этом этапе следует использовать необработанные планшеты или чашки для культивирования тканей, пригодные для культивирования клеток.

(3) Удалите раствор RetroNectin, а затем заблокируйте соответствующим объемом*3 стерильного 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA, FractionV) в PBS. Дайте планшету постоять при комнатной температуре в течение 30 минут.

* 3 Используйте 0,5 мл на каждую лунку 24-луночного планшета или 2 мл на каждую лунку 6-луночного планшета.

(4) Удалите раствор BSA и один раз промойте планшет соответствующим объемом HBSS/Hepes или PBS. После удаления промывочного раствора планшет готов к использованию. Планшет с покрытием RetroNectin можно закрыть парафильмом и хранить при температуре 4°C до одной недели.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

【 2. Трансдукция генов 】

Существует два метода трансдукции генов с использованием реагента RetroNectin: метод заражения ретронектин-связанным вирусом (RBV) (раздел A) и метод заражения супернатантом (SN) (раздел B). В методе инфицирования RBV ретровирусные частицы сначала связывают с планшетом, покрытым реагентом RetroNectin, а клетки-мишени добавляют после удаления супернатанта вируса. В методе заражения SN раствор вируса и клетки-мишени смешивают, а затем добавляют в планшет, покрытый RetroNectin.

Когда раствор вируса используется непосредственно для инфицирования вирусом без очистки, эффективность трансдукции генов может быть снижена из-за загрязнения молекулами, подавляющими инфекцию. В таких случаях рекомендуется метод инфицирования RBV. С помощью этого метода ингибиторные молекулы могут быть удалены путем связывания вирусов с реагентом RetroNectin и удаления супернатанта.

Примечание: Использование временной производственной системы, такой как Retrovirus PackagingKit Eco (Cat. # 6160)*/Retrovirus PackagingKit Ampho (Cat. # 6161)* и pDON-AI-2 NeoDNA (Cat. # 3653)/pDON-AI-2DNA (Cat. # 3654), ретровирусные векторы можно приготовить в течение одной недели.

* Доступно не во всех географических регионах. Уточняйте наличие в вашем регионе.

A. Метод заражения ретронектин-связанным вирусом (RBV)

A-1. Приготовление планшета с вирусом без центрифугирования

1. Добавить ретровирусный супернатант 125-250 мкл/см2 на плашку, покрытую ретронектином.
2. Инкубируйте от 4 до 6 часов при 32℃ или 37℃ и 5% CO.2инкубаторе для стимуляции связывания вирусных частиц с реагентом RetroNectin.
3. Удалите супернатант, но не давайте планшету высохнуть. Промойте планшет соответствующим объемом PBS или PBS, содержащим 0,1–2% альбумина (BSA или HSA). После промывки провести заражение по A-3.

A-2. Приготовление планшета для связывания вируса центрифугированием

Если титр вируса достаточно высок, связывание вирусов с реактивом RetroNectin можно осуществить без центрифугирования, как описано в A-1.

Однако, если титр низкий или требуется более высокая эффективность трансдукции генов, предпочтительнее связывание вируса центрифугированием. При этом методе время, необходимое для связывания ретровируса, значительно меньше (2 часа против 4-6 часов для метода без центрифугирования). Планшеты, такие как необработанные планшеты для культивирования клеток, которые выдерживают центрифугирование при 1000–2000 об/мин.*г*для этого метода требуется 2 часа при 32 ℃. Кроме того, обратите внимание, что возможно образование аэрозоля.

1. Добавьте исходный раствор ретровируса или разбавленный раствор в концентрации 125–500 мкл/см.2на пластину, покрытую RetroNectin.

   Примечание: Объем, который можно добавить на пластину, варьируется. Для 6-луночного планшета верхний предел составляет 3 мл (320 мкл/см2). В этом методе некоторые молекулы, ингибирующие инфекцию, не могут быть удалены путем промывания PBS. По этой причине эффективность трансдукции генов может быть снижена. В таком случае рекомендуется использовать исходный раствор вируса после разведения ростовой средой. Требуется оптимизация для определения подходящей скорости разбавления.

2. Поместите планшет в предварительно нагретую до 32 ℃ центрифугу и центрифугируйте в течение 2 часов при 32 ℃ при 1000–2000 об/мин.*г*для облегчения связывания вирусных частиц с реагентом RetroNectin.
3. Удалите супернатант, но не давайте планшету высохнуть. Промойте планшет соответствующим объемом PBS или PBS, содержащим 0,1–2% альбумина (BSA или HSA). Затем выполнить заражение вирусом по A-3.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

A-3. Вирусная инфекция

Подготовьте клетки-мишени, пока частицы ретровируса связываются с пластиной, покрытой реагентом RetroNectin. Важно, чтобы клетки-мишени находились в логарифмической фазе роста и экспрессировали интегриновые рецепторы VLA-4 и/или VLA-5. При использовании гемопоэтических стволовых клеток может потребоваться предварительная стимуляция цитокинами. Тип цитокина следует определять на основе ваших конкретных протоколов исследования. Примеры приведены в ссылках 3 и 5.

1. Соберите клетки-мишени и подсчитайте количество живых клеток. Затем суспендируют клетки в ростовой среде при концентрации 0,2-1 x 10^5 клеток/мл.

2. Удалите промывочный раствор с планшетов, связанных с вирусом, приготовленных A-1 или A-2. Не позволяйте пластине высохнуть. Немедленно добавьте целевые ячейки при плотности 0,5 - 2,5 x 10^4 клеток/$см^2$. Хотя оптимальная плотность клеток зависит от размера клеток и скорости их роста, исходная плотность клеток должна позволять клеткам активно расти при анализе через 2-3 дня после трансдукции. При инфицировании большего количества клеток плотность клеток можно увеличить, но после трансдукции гена клетки необходимо будет субкультивировать.

Примечание: Чтобы способствовать контакту между клетками-мишенями и вирусными частицами, планшеты можно центрифугировать после добавления клеток.

3. Инкубировать при 37 °C, 5% CO2 инкубатор на 2-3 дня.

4. Соберите как неприлипшие, так и прилипшие клетки:

(1) Перенесите супернатант в центрифужную пробирку.

(2) Восстановите оставшиеся неприкрепленные клетки, промыв планшет PBS.

(3) Отделите прилипшие клетки от планшета с помощью буфера для диссоциации клеток (Thermo Fisher Scientific), бесферментного раствора или трипсин-ЭДТА, следуя инструкциям производителя.

Примечание: Для многих типов клеток прилипшие клетки можно собирать только пипетированием.

(4) Объедините клетки, полученные на этапах (1)-(3), в одной пробирке и отцентрифугируйте, чтобы выделить клетки.

(5) Промойте клетки дважды HBSS/Hepes, собрав клетки центрифугированием. Суспендируйте клетки в HBSS/Hepes* для дальнейшего анализа.

* Для ресуспендирования можно также использовать любой буфер или среду, подходящие для дальнейшего применения клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

B. Метод заражения супернатантом (SN)

Когда используется исходный раствор вируса, рекомендуется метод RBV, описанный в A, но если используется 4-кратное разведение или более, можно использовать либо метод RBV, либо метод SN, так как будет получена эквивалентная эффективность трансдукции генов. Время, необходимое для заражения вирусом, при использовании метода SN намного короче, чем при использовании метода RBV.

1. Суспендируйте клетки-мишени в вирусном растворе, разведенном питательной средой, для приготовления клеточной суспензии.

2. Добавьте клеточную суспензию в планшет с покрытием RetroNectin при плотности 0,5 - 2,5 x 10^4 клеток/$см^2$. Хотя оптимальная плотность клеток зависит от размера клеток и скорости их роста, исходная плотность клеток должна позволять клеткам активно расти при анализе экспрессии гена через 2–3 дня после трансдукции. При инфицировании большего количества клеток можно увеличить плотность клеток, но после трансдукции гена клетки необходимо будет субкультивировать.

   Примечание: Чтобы способствовать контакту между клетками-мишенями и вирусными векторами, планшет можно центрифугировать после добавления клеток.

3. Инкубируйте в инкубаторе при 37 ℃, 5% CO2 в течение 2–3 дней.

4. Соберите как неприлипшие, так и прилипшие клетки:

   (1) Перенесите супернатант в центрифужную пробирку.

   (2) Восстановите оставшиеся неприкрепленные клетки, промыв планшет PBS.

   (3) Отделите прилипшие клетки от планшета с помощью буфера для диссоциации клеток (Thermo Fisher Scientific), бесферментного раствора или трипсин-ЭДТА, следуя инструкциям производителя.

   Примечание:Для многих типов клеток прилипшие клетки можно собирать только пипетированием.

   (4) Объедините клетки, полученные на этапах (1)-(3), в одной пробирке и отцентрифугируйте, чтобы выделить клетки.

   (5) Промойте клетки дважды HBSS/Hepes, собрав клетки центрифугированием. Суспендируйте клетки в HBSS/Hepes* для дальнейшего анализа.

   * Для ресуспендирования можно также использовать любой буфер или среду, подходящие для дальнейшего применения клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

VI. Рекомендации

1) Kimizuka F, Taguchi Y, OhdateY, KawaseY, ShimojoT, HasinoK, Kato I, Sekiguchi K. и Титани К. Производство и характеристика функциональных доменов фибронектина человека, экспрессируемых в*Кишечная палочка. Джей Биохим.* (1991)**110**: 284-291.

2) HanenbergH, XiaoXL, DillooD, HasinoK, Kato I и WilliamsDA. Колокализация ретровируса и клеток-мишеней на специфических фрагментах фибронектина увеличивает генетическую трансдукцию клеток млекопитающих.*NatMed.* (1996)**2**: 876-882.

3) Ханенберг Х., Хашино К., Кониши Х., Хок Р.А., Като И. и Уильямс Д.А. Оптимизация ретровирусного переноса генов с помощью фибронектина в CD34+ гемопоэтические клетки человека. *HumGene Ther.* (1997)**8**: 2193-2206.

4) Поллок К.Е., Ханенберг Х., Ноблитт Т.В., Шредер В.Л., Като И., Эмануэль Д. и Уильямс Д.А. Высокоэффективный перенос генов в нормальные и дефицитные по аденозиндеаминазе Т-лимфоциты опосредован трансдукцией фрагментов рекомбинантного фибронектина. *Джей Вирол.* (1998)**72**: 4882-4892.

5) ChonoH, YoshiokaH, UenoM и Kato I. Удаление ингибирующего вещества с помощью пластин с рекомбинантным фибронектином-CH-296 повышает эффективность ретровирусной трансдукции CD34+CD38-клеток костного мозга.*Джей Биохим.* (2001)**130**: 331-334.

【Информация: размножение Т-клеток при стимуляции RetroNectin】

Реагент RetroNectin широко используется для усиления ретровирусного и лентивирусного переноса генов в клетки млекопитающих.

Кроме того, реагент RetroNectin усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов. Т-клетки обычно размножаются в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) путем стимуляции анти-CD3-антителом. Добавление RetroNectin на этом этапе стимуляции резко увеличивает эффективность размножения Т-клеток. Кроме того, Т-клетки, размноженные этим методом, содержат большую часть менее дифференцированных Т-клеток (наивных Т-клеток). Наивные Т-клетки обладают способностью дифференцироваться в цитотоксические Т-клетки.*invivo*.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

VII. сопутствующие товары

[Ретровирусные векторы]

pDON-5NeoDNA (кат. № 3657)
pDON-5DNA (кат. № 3658)
pDON-AI-2NeoDNA (кат. № 3653)
pDON-AI-2DNA (кат. № 3654)
pMEI-5NeoDNA (кат. № 3655)
pMEI-5DNA (кат. № 3656)

[Получение рекомбинантных ретровирусных частиц]

Retrovirus PackagingKit Ampho (кат. № 6161)*
Retrovirus PackagingKit Eco (кат. № 6160)*
Retro-X™ System (кат. № 631508)
Универсальная упаковочная система Retro-X™ (кат. № 631530)

[Лентивирусные векторы и векторные системы]

Система экспрессии Lenti-X™ (кат. № 632164)

[Получение рекомбинантных лентивирусных частиц]

Lenti-X™293TCell Line (кат. № 632180) Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G) (кат. № 631275) Lenti-X™ HTX Экотропная упаковочная система (кат. № 631251)

[Другой]

RetroNectin®Dish (RetroNectinPre-coatedDish, 35mmф) (Cat. #T110A)*
RetroNectin®GMPgradeRecombinantHumanFibronectinFragmentCH-296 (Cat.#T201)*
Retro-X™qRT-PCR TitrationKit (Cat. #631453)
Набор для титрования Lenti-X™qRT-PCR (кат. № 631235)

* Доступно не во всех географических регионах. Уточняйте наличие в вашем регионе.

RetroNectin является зарегистрированным товарным знаком TAKARABIO INC.
Lenti-XandRetro-X являются товарными знаками Takara BioUSA, Inc.

ПРИМЕЧАНИЕ :Этот продукт предназначен только для исследований. Он не предназначен для использования в терапевтических или диагностических процедуры для людей или животных. Кроме того, не используйте этот продукт в качестве продуктов питания, косметических средств, предметов домашнего обихода и т. д.

Продукция Takara не может быть перепродана или передана, модифицирована для перепродажи или передачи или использована для производства коммерческих продуктов без письменного разрешения TAKARABIO INC.

Если вам требуются лицензии для другого использования, свяжитесь с нами по телефону +81 77 565 6973 или с нашего веб-сайта www.takara-bio.com.

Использование вами этого продукта также зависит от соблюдения любых применимых лицензионных требований, описанных на веб-странице продукта. Вы несете ответственность за рассмотрение, понимание и соблюдение любых ограничений, налагаемых такими заявлениями.

Все торговые марки являются собственностью их соответствующих владельцев. Некоторые товарные знаки могут быть зарегистрированы не во всех юрисдикциях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru