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.

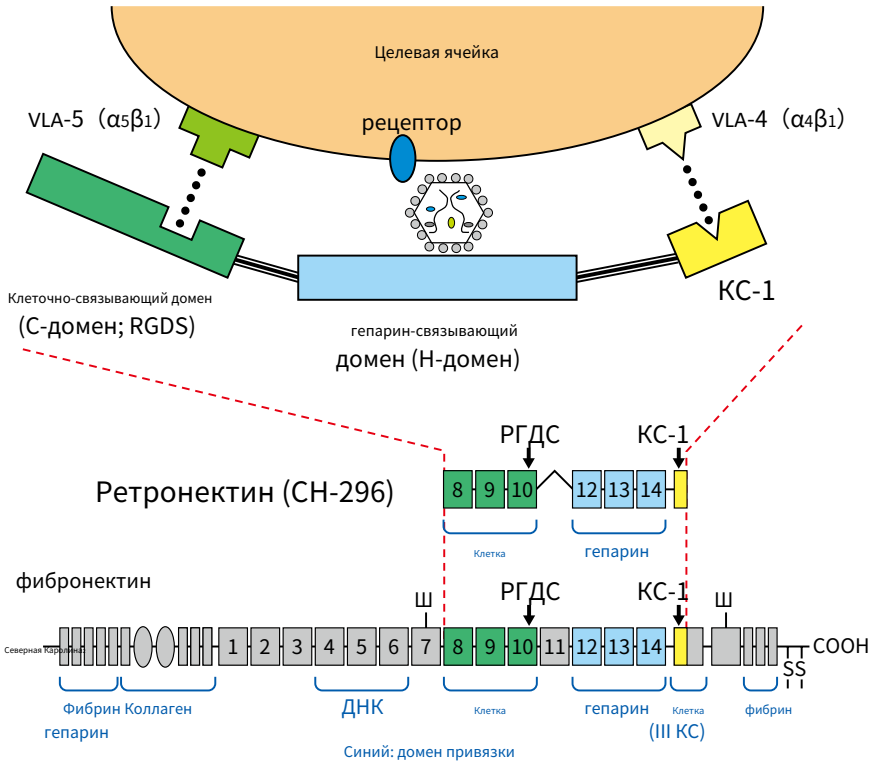


Рисунок 1. Гипотетический механизм ретронектин-опосредованной трансдукции. Клетка связывается с сайтом CS-1 через VLA-4 и с C-доменом через VLA-5. Вирусная частица может связываться с H-доменом ретронектина. Эти взаимодействия увеличивают локальные концентрации клеток и вирусных частиц, эффект, который,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