

製品コード T100A/B

研究用

Takara

RetroNectin[®]
(Recombinant Human Fibronectin Fragment)

説明書

v201603

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	3
III.	保存.....	3
IV.	必要な器具・装置および試薬.....	5
	IV-1. 器具・装置.....	5
	IV-2. 試薬.....	5
V.	RetroNectin コートプレートの作製.....	5
VI.	遺伝子導入.....	6
	A. RetroNectin-bound virus (RBV) 感染法.....	6
	A-1. 静置によるウイルス結合プレートの作製.....	6
	A-2. 遠心によるウイルス結合プレートの作製.....	6
	A-3. ウイルス感染.....	7
	B. Supernatant (SN) 感染法.....	8
VII.	参考文献.....	8
VIII.	関連製品.....	9
IX.	注意.....	10

I. 製品説明

RetroNectin (リコンビナントヒトフィブロネクチン CH-296) は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン (C-domain)、ヘパリン結合ドメイン (H-domain) および CS-1 部位の 3 種類の機能的ドメインを含む組換えタンパク質*1 です。

RetroNectin はインテグリン VLA-4、VLA-5 を発現している哺乳類細胞に対してレトロウイルスベクター*2 を介した遺伝子導入を行う際に有用です。VLA-4 を発現している細胞は CS-1 部位と、また VLA-5 を発現している細胞は細胞接着ドメイン (RGDS 配列) と接着し、一方、ウイルスベクターはヘパリン結合ドメイン (Type III repeat, 12, 13, 14) に結合することによって RetroNectin 上に共配置されます。これにより、局所的に両者の濃度が高められ、遺伝子導入が促進されると考えられます (図 1)。

タカラバイオでは、調製した組換えレトロウイルス液に含まれる感染阻害物質を除く方法を報告し、プロトコルの改良を行いました⁵⁾。

レトロウイルスベクターを介した遺伝子導入を行う際に、プロデューサー細胞から分泌されるプロテオグリカンやレトロウイルス包膜タンパク質などの物質が存在すると導入効率に影響を与えます。従って、組換えレトロウイルスを感染させる時にはこれらの阻害物質を除いておくことが重要です。

従来法*3 (Supernatant 感染法) では細胞とウイルスを混合して RetroNectin コートプレート上で感染させていたのに対し、改良法 (RetroNectin-bound virus 感染法) では組換えレトロウイルスを先に RetroNectin コートプレートに吸着させ、感染阻害物質を含むレトロウイルス液を除いた後に細胞を加え、感染させます。

* 1 : 分子量 62,613 (アミノ酸配列より)

* 2 : レンチウイルスベクターを介した遺伝子導入を行う際にも有用です。

* 3 : 従来方法でも十分な遺伝子導入効率を得ることができます。

また、改良法は適応範囲の広い方法ですが、標的細胞、ベクター、目的遺伝子によって条件検討が必要な場合もあります。

II. 内容

RetroNectin 0.5 mg (0.5 ml) (製品コード T100A)

RetroNectin 2.5 mg (2.5 ml) (製品コード T100B)

本製品は溶液品 (ろ過滅菌処理済) (1 mg/ml) です。

(形状)

12.5 mM クエン酸ナトリウム (pH6.2)、1.25% ショ糖 (Sucrose)

III. 保存

− 20℃ (凍結融解の繰り返しは 10 回程度まで可能)

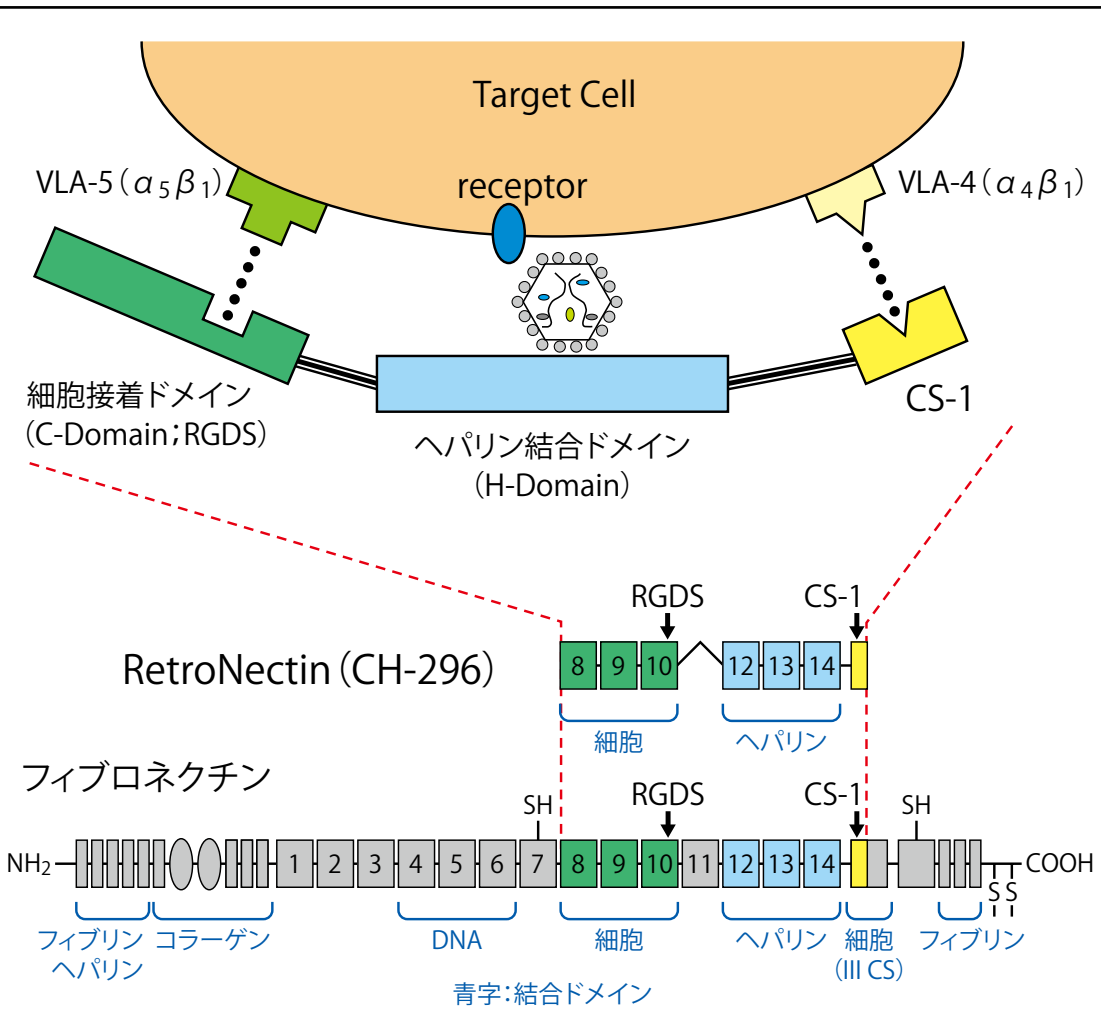


図1. フィブロネクチンとレトロネクチンの構造およびレトロネクチンでの遺伝子導入のモデル図

細胞は、VLA-4のリガンドであるCS-1部位とVLA-5のリガンドである細胞接着ドメインに結合し、また、レトロウイルスベクターはへパリン結合ドメインに結合することによってRetroNectin上に共配置されます。これにより、局所的に両者の濃度が高められ、その結果、遺伝子の導入が促進されると考えられています。

IV. 必要な器具・装置および試薬 (主なもの)

IV-1. 器具・装置

- ・ ノントリートメントタイプの細胞培養容器
- ・ 電動ピペッター
- ・ ピペットマン
- ・ 滅菌済ピペット
- ・ フィルター付滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット、クリーンベンチ
- ・ 細胞観察用顕微鏡
- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ 遠心機 (96 穴プレートで使用可能なもの)

IV-2. 試薬

- ・ 滅菌済み PBS (ー)
- ・ HBSS/Hepes (Hank's Balanced Salt Solution supplemented with 2.5% (v/v) 1 M Hepes)
- ・ 2% BSA (BSA Fraction V) /PBS 溶液

V. RetroNectin コートプレートの作製

RetroNectin は 20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 4 ~ 20 $\mu\text{g/cm}^2$ となるようにプレートにコーティングします。

1. RetroNectin 溶液を融解し均一になるように混合する (ボルテックスによる攪拌は避けてください)。使用時には滅菌済みの PBS で適当な濃度 (20 $\mu\text{g/ml}$ ~ 100 $\mu\text{g/ml}$)^{*1} になるように希釈する。
2. クリーンベンチ内で、適量の RetroNectin 希釈液をプレート^{*2}に加えてプレート全体に広げ、室温で 2 時間または 4℃で一晩放置する。24 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 0.5 ml、6 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 2 ml の RetroNectin 希釈液を加える。
3. RetroNectin 希釈液を除き、適量の 2% BSA/PBS 溶液を加えてブロッキングを行う。室温で 30 分間放置する。24 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 0.5 ml、6 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 2 ml のブロッキング液を加える。
4. 2% BSA/PBS 溶液を除き、適量の PBS または HBSS/Hepes で一度洗浄し、バッファーを除去した状態で保存する。このプレートを RetroNectin コートプレート^{*3}とする。

* 1 : 使用量の概算 : 35 mm プレート (9 cm^2) に 20 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を 2.25 ml 入れた場合、RetroNectin の使用量は 5 $\mu\text{g/cm}^2$ となります。

[注] RetroNectin がフィルターに吸着する恐れがあるため、PBS 希釈後の RetroNectin 溶液はフィルターを過ししないでください。また、低吸着タイプ以外のフィルターを使用する場合にもフィルターに吸着する恐れがありますので注意が必要です。

* 2 : プレートは必ずノントリートメントタイプのものを使用してください。

* 3 : 容器のふたをパラフィルム等でシールした場合、RetroNectin コートプレートは 4℃で 1 週間の保存が可能です。

VI. 遺伝子導入

RetroNectin を用いた遺伝子導入には、RetroNectin-bound virus (RBV) 感染法と Supernatant (SN) 感染法の 2 種類の使用があります。

RBV 感染法は、まずレトロウイルスを RetroNectin コートプレートに吸着させ、上清液を取り除いてから標的細胞を加える方法です。SN 感染法は、先にウイルス液と標的細胞を混合してから RetroNectin コートプレートに加える方法です。

293T 細胞等を使用し、レトロウイルスベクタープラスミド、*gag-pol*, *env* 遺伝子の発現プラスミドを用いて一過性に組換えレトロウイルスを調製した場合*、あるいはプロデューサー細胞より組換えレトロウイルスを回収した場合、細胞の培養上清がウイルス液となります。

このためウイルス液中には培養上清中の夾雑物質が含まれています。感染にウイルス原液を用いた場合、この夾雑物質中に含まれる感染阻害物質により、期待される遺伝子導入効率が得られない可能性があります。このような場合は RBV 感染法が推奨されます。本感染方法では、得られたウイルスを、ウイルス結合活性を持つ RetroNectin に結合させて精製するため、感染阻害物質を除去することが可能です。

*参考：組換えレトロウイルスの調製について

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161) と pDON-AI-2 DNA (製品コード 3654)、および 293T 細胞や G3T-hi 細胞などを用いれば、約 1 週間で組換えレトロウイルスを調製することができます。

レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 (製品コード 6163) は、293T 細胞を改良した細胞で、この細胞から調製した組換えレトロウイルスは RetroNectin との親和性が高く、RetroNectin との併用による標的細胞への遺伝子導入効率が有意に高いことが確認されています。特に血球系細胞を標的とした遺伝子導入に有効です。

A. RetroNectin-bound virus (RBV) 感染法

A-1. 静置によるウイルス結合プレートの作製

1. 目的遺伝子を持つ組換えレトロウイルス液の原液、あるいは希釈液を RetroNectin コートプレート上に $125 \sim 250 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ となるように加える。
2. 32°C または 37°C 、5% CO_2 インキュベーターで 4～6 時間静置し、RetroNectin 上へのウイルス粒子の吸着を促す。この操作によりレトロウイルスベクターは RetroNectin の H-domain に結合する。
3. RetroNectin 上に結合させたウイルスが乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、適量の PBS または 0.1～2% のアルブミン (BSA や HSA) を含む PBS を添加して洗浄する。この操作によりレトロウイルス液に含まれる感染阻害物質を除くことが可能である。以下、A-3 に示す方法に従って細胞へのウイルス感染を行う。

A-2. 遠心によるウイルス結合プレートの作製

レトロウイルスベクターの力価が充分高い場合、A-1 で示したように、静置によって RetroNectin 上へのウイルスの吸着を促すことも可能です。しかし、レトロウイルスベクターの力価が低い場合、あるいはより高効率に細胞への遺伝子導入を行いたい場合には、次に示すような遠心による RetroNectin 上へのウイルスの結合法も有効です。この場合、レトロウイルスベクターを結合させる時間は静置の場合の 4～6 時間から 2 時間へと短縮することが可能です。この方法では 32°C 、 $1,000 \sim 2,000 \times g$ 、2 時間の遠心に耐え得る容器が必要で、例えばノントリートマルチウェルプレートやポリスチレン遠心管、ポリプロピレン遠心管が使用できますが、エアロゾルの発生がありうることを十分注意して封じ込めの措置を講じて使用してください。

-
1. 目的遺伝子を持つ組換えレトロウイルス液の原液*、あるいは希釈液を RetroNectin コート容器上に $125 \sim 500 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ となるように加える。

*注：容器に加えることのできる液の上限は容器の形状によって変動します。6 ウェルプレートの場合には上限を 3 ml ($320 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) に設定してください。また、組換えレトロウイルス原液を用いて遠心により RetroNectin 上にウイルスを吸着させた場合、静置の場合とは異なり、PBS の洗浄により除去できない感染阻害物質も存在します。このため、細胞への遺伝子導入効率は低くなる場合があります。このような場合にはウイルス原液を培地などで希釈して使用することをお勧めします。ただし、適した希釈倍率を選択するには条件検討が必要です。

2. 32°C に保温した遠心機に 1. のレトロウイルスを加えた容器をセットし、 32°C で $1,000 \sim 2,000 \times g$ にて 2 時間遠心し、RetroNectin 上へのウイルス粒子の吸着を促す。この操作によりレトロウイルスベクターは RetroNectin に結合する。
3. RetroNectin 上に結合させたウイルスが乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、適量の PBS や 0.1 ~ 2% のアルブミン (BSA や HSA) を含む PBS などの溶媒を添加して洗浄する。以下、A-3 の工程によりウイルス感染を行う。

A-3. ウイルス感染

RetroNectin プレートにレトロウイルスベクターを結合させている間を利用し、標的細胞の調製を行う。標的細胞は、対数増殖期にありインテグリン VLA-4 または VLA-5 を発現していることが重要である。標的細胞が造血幹細胞の場合は、サイトカインで刺激しておく必要がある。サイトカインの組成は目的の実験系に応じて調製する (参考文献 3、5 参照)。

1. 標的細胞を集め、生細胞数を測定する。細胞数が $0.2 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ になるように培養用培地に懸濁する。
2. A-1 あるいは A-2 で作製したウイルス結合プレートの溶媒を除去する。除去した後は放置せず、速やかに細胞懸濁液を加える。細胞懸濁液は $0.5 \sim 2.5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ となるように加える。適切な細胞濃度は標的細胞の大きさや増殖率によって変わるが、遺伝子導入から 2 ~ 3 日後の発現解析の際に適切な細胞密度になっていることが望ましい。より多くの細胞に遺伝子導入したい場合には細胞密度を高めても良いが、遺伝子導入後、細胞を継代する必要がある。

*注：標的細胞とウイルスベクターの接触を促す目的で、細胞添加後、再び容器 (プレートに限る) を遠心しても良い。

3. 37°C 、5% CO_2 インキュベーターで培養する。
4. 下記の方法でプレートに接着している細胞と非接着細胞の両方を集める。細胞によっては、ピペティングのみで回収できる場合もある。
 - (1) 培養液を遠心チューブに移す。
 - (2) プレートに残った非接着細胞を PBS で洗って回収する。
 - (3) 定法に従って Cell Dissociation Buffer, enzyme free, PBS (Life Technologies) またはトリプシン-EDTA 溶液でプレートに接着している細胞を剥がす。
 - (4) (1)、(2)、(3) で回収した細胞を同じ遠心チューブに入れ、遠心によって細胞を集める。
 - (5) HBSS/Hepes を用いて遠心により細胞を 2 回リンスした後、HBSS/Hepes などに懸濁し、後の実験に使用する。

B. Supernatant (SN) 感染法

ウイルス液を原液で使用する場合、A. で示した RBV 法を推奨していますが、4 倍以上に希釈して用いる場合には RBV 法と同等の遺伝子導入効率を得ることができるため、RBV 法、SN 法をお好みに応じて選択してください。SN 法は RBV 法と比較し、ウイルス感染に要する時間が非常に短縮されているのが特徴です。

1. 標的細胞を培養用培地で希釈したウイルス液で懸濁し、細胞懸濁液を調製する。
2. RetroNectin コートプレート上に 1 の細胞懸濁液を $0.5 \sim 2.5 \times 10^4$ cells/cm² となるように加える。適切な細胞濃度は標的細胞の大きさや増殖率によって変わるが、遺伝子導入から 2～3 日後の発現解析の際に適切な細胞密度になっていることが望ましい。より多くの細胞に遺伝子導入したい場合には細胞密度を高めても良いが、遺伝子導入後、細胞を継代する必要がある。

*注：標的細胞とウイルスベクターの接触を促す目的で、細胞添加後、プレートを遠心しても良い。

3. 37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養する。
4. 下記の方法でプレートに接着している細胞と非接着細胞の両方を集める。細胞によっては、ピペティングのみで回収できる場合もある。
 - (1) 培養液を遠心チューブに移す。
 - (2) プレートに残った非接着細胞を PBS で洗って回収する。
 - (3) 定法に従って Cell Dissociation Buffer, enzyme free, PBS (Life Technologies) またはトリプシン-EDTA 溶液でプレートに接着している細胞を剥がす。
 - (4) (1)、(2)、(3) で回収した細胞を同じ遠心チューブに入れ、遠心によって細胞を集める。
 - (5) HBSS/Hepes を用いて遠心により細胞を 2 回リンスした後、HBSS/Hepes などに懸濁し、後の実験に使用する。

VII. 参考文献

- 1) Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, and Titani K. (1991) Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem.* **110**: 284-291.
- 2) Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, and Williams DA. (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* **2**: 876-882.
- 3) Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, and Williams DA. (1997) Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34⁺ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther.* **8**: 2193-2206.
- 4) Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, and Williams DA. (1998) High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol.* **72**: 4882-4892.
- 5) Chono H, Yoshioka H, Ueno M, and Kato I. (2001) Removal of inhibitory substance with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells. *J Biochem.* **130**: 331-334.

【備考：RetroNectin 共刺激による T リンパ球 (T 細胞) 拡大培養】

RetroNectin 法は、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを介する哺乳類細胞への遺伝子導入法として広く活用されていますが、さらに、T リンパ球の培養を増強する効果が確認されました。

T 細胞の拡大培養は、通常、抗 CD3 抗体刺激によりインターロイキン -2 (IL-2) の存在下で行います。このとき RetroNectin を共存させることで拡大培養効率が格段に増大します (ウェブカタログ技術情報参照)。また、得られた T 細胞集団中には未分化な細胞であるナイーブ T 細胞が多く含まれます。ナイーブ T 細胞は、抗原提示を受け細胞傷害性 T 細胞に分化する能力をもつ細胞です。(詳細はウェブサイトをご参照ください。)

VIII. 関連製品

レトロウイルスベクタープラスミド：

- pDON-5 Neo DNA (製品コード 3657)
- pDON-5 DNA (製品コード 3658)
- pDON-AI-2 Neo DNA (製品コード 3653)
- pDON-AI-2 DNA (製品コード 3654)
- pMEI-5 Neo DNA (製品コード 3655)
- pMEI-5 DNA (製品コード 3656)

siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド：

- pSINsi-hH1 DNA (製品コード 3660)
- pSINsi-hU6 DNA (製品コード 3661)
- pSINsi-mU6 DNA (製品コード 3662)

ダブルノックアウトタイプの siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド：

- pSINsi-DK I DNA Set (製品コード 3663)
- pSINsi-DK II DNA Set (製品コード 3664)

組換えレトロウイルスの調製：

- Retrovirus Packaging Kit Eco (製品コード 6160)
- Retrovirus Packaging Kit Ampho (製品コード 6161)
- レトロウイルス調製細胞 (G3T-hi 細胞) (製品コード 6163)
- Retrovirus Constructive System Eco (製品コード 6164)
- Retrovirus Constructive System Ampho (製品コード 6165)

ヒト iPS 細胞誘導用組換えレトロウイルスの調製：

- Human iPS Cell Generation™ All-in-One Vector (製品コード 3671)
- Human iPS Cell Generation™ Vector Set (製品コード 3670)

レンチウイルスベクターの調製：

- Lentiviral High Titer Packaging Mix with pLV5IN シリーズ (製品コード 6950 ~ 6955)
- Lenti-X™ 293T Cell Line (製品コード 632180)
- Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G) (製品コード 631275 ほか)

その他：

- RetroNectin® Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm φ) (製品コード T110A)
- RetroNectin® GMP grade Recombinant Human Fibronectin Fragment CH-296 (製品コード T201)

IX. 注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- 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。
- RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Cell Generation はタカラバイオ株式会社の、Lenti-X 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

TakaRa テクニカルサポートライン

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

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社