

RetroNectin[®] Pro

(Recombinant Human Fibronectin Fragment)

Code No. T101A

Size: 0.5 mg / 0.5 ml

Code No. T101B

Size: 2.5 mg / 2.5 ml

Description:

RetroNectin Pro (Recombinant Human Fibronectin Fragment) is a recombinant human fibronectin fragment (rFN-CH-296) and composed of three functional domains: the cell-binding domain (C-domain), heparin-binding domain (H-domain), and CS-1 sequence (Figure). The fragment enhances retroviral/lentiviral-mediated gene transduction by aiding the co-localization of target cells and virions. Specifically, virus particles bind RetroNectin via interaction with the H-domain, and target cells bind mainly through the interaction of cell surface integrin receptor VLA-5 and VLA-4 with the fibronectin C-domain and CS-1 site, respectively. By facilitating close proximity, RetroNectin can enhance retroviral-mediated gene transfer to target cells. In addition, the reagent enhances the proliferation of T lymphocytes. T cells are conventionally expanded in the presence of Interleukin-2 (IL-2) by stimulation with anti-CD3 antibody. The addition of RetroNectin in this stimulation step dramatically increases the efficiency of T cell expansion. Moreover, T cells expanded with this method contain a high proportion of less-differentiated T cells (naive T cells) that have the ability to differentiate into cytotoxic T cells *in vivo*.

Through the optimization of the manufacturing process, RetroNectin Pro is suitable for research and development in the field of cell and gene therapy such as CAR-T cell therapy. For more information on the RetroNectin method, please refer to technical literature and product information available online.

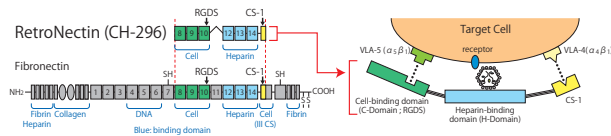


Figure. The hypothesized mechanism of RetroNectin-mediated transduction. The cell binds to the CS-1 site via VLA-4, and to the C-domain via VLA-5. The viral particle can bind to the H-domain of RetroNectin. These interactions increase the localized concentrations of cells and viral particles, an effect that is thought to enhance gene transduction.

Storage: -20°C

Molecular Mass: 62,617 Da (amino acid sequence)

Source: *E. coli* expressing human fibronectin fragment CH-296

Purity: >90% by HPLC

Form: RetroNectin solution containing 12.5 mM sodium citrate (pH 6.2) and 1.25% sucrose

Packaging: RetroNectin is provided as a sterile 1 mg/ml solution.

Applications: To enhance the efficiency of gene transfer into mammalian cells and enhance the proliferation of T lymphocytes.

Materials Required but not Provided:

[Reagents]

- Sterile PBS (-)
- HBSS/Hepes (Hank's Balanced Salt Solution supplemented with 2.5% (v/v) 1 M Hepes)
- 2% bovine serum albumin (BSA Fraction V)/PBS Solution

[Equipment]

- Non-treated tissue culture plates or dishes
- Electric pipetter
- Pipetter
- Sterile pipettes
- Sterile tips with filters
- Safety cabinet or clean workstation

Precautions for Use:

- Work under sterile conditions.
- Freezing and thawing can be repeated up to 10 times.
- Do not mix the solution vigorously. Do not vortex.
- To avoid loss of RetroNectin fragment, do not filter-sterilize RetroNectin solution diluted with PBS.

Protocols:

[Preparation of RetroNectin-Coated Plates]

Coat a plate using 20 - 100 $\mu\text{g/ml}$ RetroNectin with a volume corresponding to 4 - 20 $\mu\text{g/cm}^2$ plate area.

1. Prior to coating, prepare a RetroNectin solution (20 - 100 $\mu\text{g/ml}^*$) by diluting with sterile PBS.
2. Dispense an appropriate volume^{*2} of sterile RetroNectin solution into each plate and allow the plate to stand for 2 hours at room temperature or at 4°C overnight.
Note: Non-treated, cell culture-grade tissue culture plates or dishes should be used in this step.
3. Remove the RetroNectin solution and then block with an appropriate volume^{*2} of sterile 2% bovine serum albumin (BSA, Fraction V) in PBS. Allow the plate to stand at room temperature for 30 minutes^{*3}.
4. Remove the BSA solution, and wash the plate once with an appropriate volume of HBSS/Hepes or PBS. After removing the wash solution, the plate is ready for use. The RetroNectin-coated plate can be sealed with Parafilm and stored at 4°C for up to one week.

^{*1} Example: calculating the amount of RetroNectin reagent:

When 2.25 ml of RetroNectin solution at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ is placed into a 35 mm diameter dish (9 cm^2), the concentration used for coating is 5 $\mu\text{g/cm}^2$.

^{*2} 0.5 ml for each well of a 24-well plate or 2 ml for each well of a 6-well plate.

^{*3} If the plates or the dishes are to be used immediately, the blocking step with 2% BSA/PBS solution can be omitted. In this case, repeat the washing with PBS or HBSS/Hepes in Step 4. twice.

Quality Statement:

This product does not contain any human- or animal-derived materials in the final formulation.

References:

- 1) Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, and Titani K. Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem.* (1991) **110**: 284-291.
- 2) Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, and Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* (1996) **2**: 876-882.
- 3) Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, and Williams DA. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34⁺ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther.* (1997) **8**: 2193-2206.
- 4) Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, and Williams DA. High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol.* (1998) **72**: 4882-4892.
- 5) Chono H, Yoshioka H, Ueno M, and Kato I. Removal of inhibitory substance with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells. *J Biochem.* (2001) **130**: 331-334.
- 6) Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaie C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H, Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, and Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol.* (2014) **44**: 1747-58.

Related Products:

Anti-CD3 mAb GMP grade (Cat. #T210)

LymphoONE[®] T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, 1L Bottle (Cat. #WK552S)*

* Not available in all geographic locations. Check for availability in your area.

RetroNectin and LymphoONE are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us from our website at www.takarabio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

RetroNectin® Pro

(Recombinant Human Fibronectin Fragment)

Code No. T101A

容量：0.5 mg / 0.5 ml

Code No. T101B

容量：2.5 mg / 2.5 ml

● 製品説明

RetroNectin Pro (Recombinant Human Fibronectin Fragment) 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 (図) の3種類の機能性ドメインを含む組換えタンパク質である。RetroNectin 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に広く活用されている。さらに、RetroNectin は T 細胞の増殖培養において、インターロイキン-2 (IL-2) 等のサイトカインの存在下で抗 CD3 抗体との共刺激を行うことができる。この方法は増殖効率に優れており、増殖した T 細胞には高い割合でナイーブ T 細胞*を含む特徴がある (用法詳細は、弊社ウェブサイトをご参照ください)。

*：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

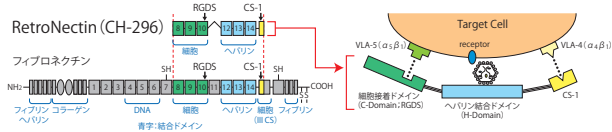


図. フィブロネクチンとレトロネクチンの構造およびレトロネクチンでの遺伝子導入のモデル図

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ヘパリン結合ドメインに結合することによって RetroNectin 上に共配置される。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る。

● 保存 - 20℃

● 分子量 62,617 Da (アミノ酸配列より)

● 起源 *E. coli* expressing human fibronectin fragment CH-296

● 純度 HPLC にて純度 90% 以上

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

● 包装形態 溶液品 (ろ過滅菌処理済) (1 mg/ml)

● 用途 哺乳類細胞への遺伝子導入補助剤、T リンパ球の増殖促進補助剤

● 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

[試薬]

- ・滅菌済み PBS (一)
- ・HBSS/Hepes (Hank's Balanced Salt Solution supplemented with 2.5% (v/v) 1 M Hepes)
- ・2% BSA (BSA Fraction V) /PBS 溶液

[器具・機器]

- ・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

● 使用上の注意

- ・無菌的な環境下で作業してください。
- ・凍結融解の繰り返しは、10 回程度まで可能です。
- ・ボルテックスによる攪拌は避けてください。
- ・レトロネクチンが吸着する恐れがあるため、PBS で希釈した RetroNectin 溶液は、フィルター滅菌しないでください。

● 操作

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する。

1. RetroNectin 溶液を融解し均一になるように混合する。使用時には滅菌済みの PBS で適当な濃度 (20 ~ 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、適当量の 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、適当量の 2% BSA/PBS 溶液を加えてブロッキングを行い、室温で 30 分間放置する*3。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、適当量の 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*4 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 $\mu\text{g/cm}^2$ となる。

*2：プレートは必ずノントリートメントタイプを使用する。

*3：RetroNectin コートしたプレートをすぐに使用する場合は、2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作は省くことができる。この場合、ステップ 4 の PBS または HBSS/Hepes による洗浄を 2 回繰り返す。

*4：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。

● 品質について

本製品の最終組成液には、ヒトまたは動物由来成分は含まれない。

● 参考文献

- 1) Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, and Titani K. Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem.* (1991) **110**: 284-291.
- 2) Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, and Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* (1996) **2**: 876-882.
- 3) Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, and Williams DA. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34⁺ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther.* (1997) **8**: 2193-2206.
- 4) Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, and Williams DA. High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol.* (1998) **72**: 4882-4892.
- 5) Chono H, Yoshioka H, Ueno M, and Kato I. Removal of inhibitory substance with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells. *J Biochem.* (2001) **130**: 331-334.
- 6) Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaie C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H, Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, and Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol.* (2014) **44**: 1747-58.

● 関連製品

Anti-CD3 mAb GMP grade (製品コード T210)

LymphoONE® T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, 1L Bottle

(製品コード WK552S)

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。本データシート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。

v202409

タカラバイオ株式会社

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999

Fax 077-565-6995