

FAQs: RetroNectin® Recombinant Human Fibronectin Fragment

Contents:

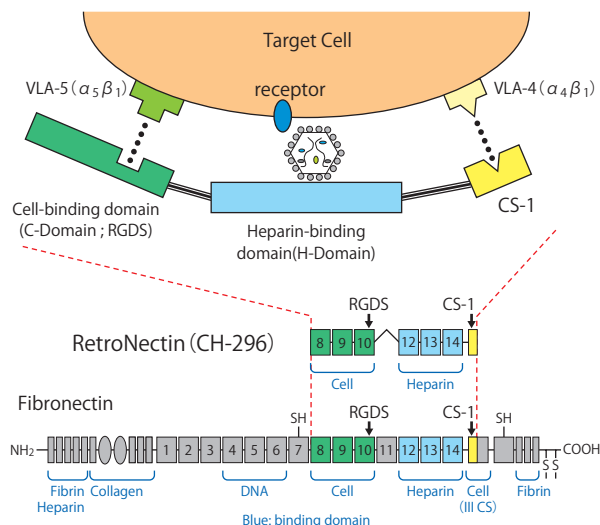
- Q1 Fibronectin이란 무엇인가요?
 - Q2 RetroNectin은 어떻게 세포와 virus간 co-localize 하나요? Virus particle이 결합하는 위치는 어디인가요?
 - Q3 Very Late Antigen-4 (VLA-4)와 Very Late Antigen-5 (VLA-5)는 무엇인가요?
 - Q4 RetroNectin을 적용 할 수 있는 세포의 종류는 무엇인가요?
 - Q5 어떤 Cell이 VLA-4와 VLA-5를 발현하나요?
 - Q6 RetroNectin은 다양한 envelopes (Eco, Amphi, VSV-G pseudo형태)에 사용 가능한가요?
 - Q7 RetroNectin은 Lentivirus/Retrovirus의 도입효율 증가 목적 외에 Viral vector 또는 DNA의 삽입 목적으로 사용할 수 있나요?
 - Q8 RetroNectin을 사용하면 도입 효율을 얼마나 증가시킬 수 있나요?
 - Q9 RetroNectin을 사용하면 일반적으로 세포 독성이 얼마나 관찰되나요?
 - Q10 RetroNectin은 polybrene과 함께 사용할 수 있나요?
 - Q11 RetroNectin은 어떤 형태의 plate를 사용해야 하나요?
 - Q12 코팅된 조직 배양 plate를 사용하였을 때 효율은 어떠한가요?
 - Q13 RetroNectin은 얼마나 많이 Freeze / Thaw가 가능한가요?
 - Q14 RetroNectin이 coating된 plate(pre-coated RetroNectin plate)는 얼마나 안정한가요?
 - Q15 RetroNectin은 사용 전 filter 멸균 과정이 필요 한가요? 만약 필요하다면, 어떤 타입의 Filter를 사용해야 하나요?
 - Q16 Clinical-grade (GMP) RetroNectin도 판매하나요?
 - Q17 RetroNectin을 X-fold bag과 같은 cell-culture bag에 coating 할 수 있나요?
 - Q18 도입 효율을 증가시키는 방법이 있을까요?
 - Q19 RetroNectin이 코팅된 plate로부터 세포를 분리(dissociation)할 때 추천되는 방법이 있나요?
 - Q20 RetroNectin이 코팅된 plate로부터 Trypsin 또는 Cell Dissociation Buffer를 사용하여 세포를 분리한 후, 다시 같은 plate에 세포가 부착되나요? 만약 96 well plate에서 FACS를 한다면, 세포를 새로운 plate로 옮겨야 하나요?
 - Q21 RetroNectin을 사용하여 Virus가 도입된 세포를 plate로부터 resuspension 하는 방법이 있나요?
- 예) Jurkat cell 사용하여 세포 표면의 마커인 CD154와 CD69를 염색하여, Flow cytometry로 분석하고 싶은데, Trypsin을 사용하면 세포 표면 마커가 degradation 된다고 합니다.

Q1 Fibronectin이란 무엇인가요?

Answer 1: Fibronectin이란 높은 분자량 (220-250 kD)을 가진 세포외기질의 구성 요소 중 하나입니다. Fibronectin은 dimer형태로 존재하며, 세포의 이동(cell migration), 형태(morphology), 성장(growth)과 부착(adhesion)에 관여합니다.

Q2 RetroNectin은 어떻게 세포와 virus간 co-localize 하나요? Virus particle이 결합하는 위치는 어디인가요?

Answer 2: RetroNectin은 약 63 kD의 단백질 (574개의 아미노산으로 구성)로 central cell-binding domain (형태 III repeat 8, 9, 10)과 high affinity heparin-binding domain II (형태 III repeat 12, 13, 14)와 CS-1 site (human Fibronectin의 IIICS region의 일부로 구성되어 있습니다. RetroNectin은 Lentivirus/Retrovirus particles과 target 세포를 co-localization시킴으로써, 유전자 도입효율을 증가시킬 수 있습니다. Co-localization은 RetroNectin (CH-296)의 heparin-binding domain II가 직접 viral particle과 결합하고, CS-1 site와 cell-binding domain이 세포의 VLA-4, VLA-5과 결합하여 이루어집니다.



FAQs: RetroNectin® Reagent, cont.

Q3 Very Late Antigen-4 (VLA-4)와 Very Late Antigen-5 (VLA-5)는 무엇인가요?

Answer 3: VLA-4와 VLA-5는 integrin superfamily에 속해 있으며, integrin $\alpha 4\beta 1$ 과 integrin $\alpha 5\beta 1$ 으로 알려져 있습니다. Integrin은 세포 표면의 heterodimer로, 세포 외 기질과 세포 내 세포골격단백질의 상호작용을 조절합니다.

Q4 RetroNectin은 어떤 cell에 사용할 수 있나요?

Answer 4: RetroNectin은 integrin VLA-4 또는 VLA-5를 발현하는 세포에 매우 효과적입니다. 이러한 integrin 분자들은 Fibronectin의 CS1 site와 cell-binding domain에 상호작용합니다.

Q5 어떤 Cell이 VLA-4와 VLA-5를 발현하나요?

Answer 5: VLA-4를 발현하는 세포는 대표적으로, T cells, B cells, monocytes, NK cells, eosinophils, bone marrow monocytic cells과 lymphoid progenitors이며, thymocytes, activated T-cells과 mast cell은 VLA-5를 발현한다고 알려져 있습니다.

Q6 RetroNectin은 다양한 envelopes (Eco, Ampho, VSV-G pseudo형태)에 사용 가능하나요?

Answer 6: RetroNectin은 ecotropic과 amphotropic 모두 효과적이며, GALV 형태의 envelope에도 사용 가능합니다. VSV-G (Vesicular stomatitis virus G) pseudo형태의 Lentivirus/Retrovirus도 RetroNectin이 코팅된 plate를 사용하면 세포내 도입효율을 높일 수 있습니다.

Q7 RetroNectin은 Lentivirus/Retrovirus의 도입효율 증가 목적 외에 Viral vector 또는 DNA의 삽입 목적으로 사용할 수 있나요?

Answer 7: RetroNectin은 lentivirus의 도입 효율을 증가시키는데 사용할 수 있습니다. RetroNectin이 Viral vector 또는 DNA의 도입에 효과적인지에 대해서는 알려져 있지 않습니다.

Q8 RetroNectin을 사용하면 도입 효율을 얼마나 증가시킬 수 있나요?

Answer 8: Viral supernatant infection method (세포와 virus를 섞은 후 RetroNectin에 노출)를 사용하였을 경우, RetroNectin은 human CD34+ cell에서 50~70%, mouse bone marrow mononuclear cell에서 20~30%까지 virus 도입효율을 증가시켰습니다.

Q9 RetroNectin을 사용하면 일반적으로 세포 독성이 얼마나 관찰되나요?

Answer 9: Polybrene에 비해 RetroNectin은 독성이 매우 낮은 것으로 확인되었습니다. 예를 들면, 0.25 mg/ml의 RetroNectin이 첨가된 배지에서 NIH3T3 cells을 배양한 결과, 세포의 성장에는 거의 영향이 없었습니다.

Q10 RetroNectin은 polybrene과 함께 사용할 수 있나요?

Answer 10: RetroNectin과 polybrene을 함께 사용하면 오히려 유전자 도입효율이 감소하므로, 동시에 사용하는 것은 권장되지 않습니다.

Q11 RetroNectin은 어떤 형태의 plate를 사용해야 하나요?

Answer 11: RetroNectin의 코팅을 위해서는 코팅이 되지 않은 조직 배양 plate나 dish를 사용해야 합니다. 다카라바이오에서는 코팅 plate (예: collagen 코팅 plate)와 코팅이 되지 않은 plate를 사용하여 실험한 결과, 코팅 plate는 효율이 1/5로 감소하는 것을 확인하였습니다. 다카라바이오에서는 6-well BD-Falcon (#351146) plate의 사용을 권장합니다.

Q12 코팅된 조직 배양 plate를 사용하였을 때 효율은 어떠한가요?

Answer 12: 실험 결과 코팅이 되지 않은 plate에 RetroNectin을 코팅한 후 virus 도입 효율 측정결과 30% 이상을 보였지만, 코팅이 되어있는 plate에 RetroNectin을 코팅하여 측정한 결과 1~3% 정도의 효율을 나타내었습니다.

FAQs: RetroNectin® Reagent, cont.

만약 double 코팅된 plate가 필요할 경우, 두 가지 방법에 따라 테스트해보시기 바랍니다.

- (1) RetroNectin을 먼저 코팅한 후 collagen (또는 다른 물질) 코팅
- (2) Collagen (또는 다른 물질)을 먼저 코팅한 후, RetroNectin 코팅

위의 두 가지 방법의 도입 효율이 좋지 않다면, 아래의 방법으로 진행해 주시기 바랍니다.

코팅되지 않은 plate에 RetroNectin을 코팅시켜 유전자 도입을 하는 실험 방법을 그대로 수행합니다.

Virus 도입 후, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 4시간 동안 배양합니다. 그리고 세포를 모아서 collagen (또는 다른 물질)에 코팅된 plate에 2~3일간 배양합니다.

Q13 RetroNectin은 얼마나 많이 Freeze / Thaw가 가능한가요?

Answer 13: RetroNectin solution (1 mg/ml)은 최대 5번의 freeze / thaw가 가능합니다. 추가적인 freeze/thaw는 피하고, 오염에 노출되지 않도록 주의 바랍니다.

RetroNectin은 -20℃에서 1년, 4℃에서 약 3주간 안정합니다.

Q14 RetroNectin이 코팅된 plate (pre-coated RetroNectin plate)는 얼마나 오래 안정한가요?

Answer 14: RetroNectin이 코팅된 plate는 4℃에서 약 1~2개월 보관 가능합니다. (하지만, 가능하면 빨리 사용하는 것을 권장합니다.) -20℃에는 보관하지 마세요.

Q15 RetroNectin은 사용 전 filter 멸균 과정이 필요 한가요? 만약 필요하다면, 어떤 타입의 Filter를 사용해야 하나요?

Answer 15: RetroNectin은 멸균된 solution 상태로 제공됩니다. 따라서, Filter과정은 필요하지 않습니다. 만약 RetroNectin을 filter한다면, Millipore SLGV013SL 또는 SLGV004SL을 사용할 것을 권장합니다.

Q16 Clinical-grade (GMP) RetroNectin도 판매하나요?

Answer 16: 네, GMP 가이드라인에 따라 높은 퀄리티로 생산된 RetroNectin (GMP) grade (Code T202)을 판매하고 있습니다. 연구용 제품으로, ex vivo clinical application에 적용 가능합니다. (연구 목적으로 제한되어 있습니다.)

Q17 RetroNectin을 X-fold bag과 같은 cell-culture bag에 Coating 할 수 있나요?

Answer 17: 네, X-Fold bag은 RetroNectin을 사용하여 코팅 가능합니다. 아래의 적용 예를 참고바랍니다.

For X-Fold bag (85 cm²)

a) RetroNectin*을 4℃에서 overnight 또는 상온에서 2시간 동안 코팅합니다.

*최소한 9 ml의 RetroNectin (20 µg/ml)을 사용하세요.

b) PBS로 wash 합니다. (30 ml x 3번)

c) Lentivirus/Retrovirus를 첨가합니다. (4~6시간 동안)

d) PBS로 wash 합니다. (30 ml)

e) 세포를 첨가합니다. (1 x 10⁴ cells/cm²)

f) 37℃, 5% CO₂에서 3일간 배양합니다.

주의 : 이 방법은 다른 형태, 다른 브랜드의 cell culture bag과 호환되지 않을 수 있습니다.

FAQs: RetroNectin® Reagent, cont.

Q18 도입 효율을 증가시키는 방법이 있을까요?

Answer 18: 다음의 방법은 RetroNectin을 사용하여 도입 효율을 증가시키는 방법입니다. 아래의 방법을 사용하지 않더라도, RetroNectin은 Fibronectin에 비해 높은 효율을 보입니다.

- a) 고역가의(>106 cfu/ml 이상) Lentivirus/Retrovirus를 준비합니다. 60~70%의 도입 효율에 얻기 위해서는 Lentivirus/Retrovirus solution (예를 들어, measured titer $\geq 1.15 \times 10^6$)을 10배 이상 농축시키고, 이것을 pre-load 합니다.
- b) Pre-load Virus particle은 RetroNectin이 코팅된 plate에 200-250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 으로 첨가하고, 4~5시간 동안 32°C에서 배양합니다.
- c) Virus가 load 된 plate가 마르지 않도록 조심하면서, 부유물을 제거하고, PBS로 wash합니다. PBS wash 후, Target cell을 즉시 growth media와 함께 추가 합니다. 만약 plate가 마르면, 도입 효율이 크게 감소됩니다.

Q19 RetroNectin이 코팅된 plate로부터 세포를 분리(dissociation) 할 때 추천되는 방법이 있나요?

Answer 19: Fibroblast와 같이 강하게 부착되어 있는 세포는 Trypsin EDTA/phosphate-buffered saline (PBS) (without Ca^{2+} , Mg^{2+})를 사용하여 분리시킵니다.

약하게 부착되어 있는 (또는 부유 상태) 세포는 Trypsin보다 0.02% EDTA/PBS solution을 사용하여 세포를 분리시킵니다. EDTA/PBS solution으로 세포가 분리되지 않아, Trypsin을 사용하는 것은 세포에게 damage를 줄 수 있습니다.

약하게 부착되어 있는 세포를 위한 방법

- a) Transfection 이후, plate의 상층액을 centrifuge tube에 모아둡니다.
- b) PBS로 plate를 wash하여 부유 세포를 모아 둡니다.
- c) 부착되어 있는 세포를 사용자 매뉴얼에 따라 Cell Dissociation Buffer (GIBCO; enzyme free, PBS-based)로 분리합니다.
- d) 획득한 세포를 하나의 centrifuge tube에 모우고, centrifuge하여 세포를 침전시킵니다.
- e) Centrifugation 후 HBSS/Hepes를 사용하여 세포를 두 번 wash하고, HBSS/Hepes에 있는 부유 세포는 다음 단계실험에 사용합니다.

Q20 RetroNectin이 코팅된 plate로부터 Trypsin 또는 Cell Dissociation Buffer를 사용하여 세포를 분리한 후, 다시 같은 plate에 세포가 부착되나요? 만약 96 well plate에서 FACS를 한다면, 세포를 새로운 plate로 옮겨야 하나요?

Answer 20: Trypsin 또는 Cell dissociation buffer를 사용하여 분리시킨 세포를 다른 plate로 옮기지 않는다면, 같은 plate에 다시 부착될 것입니다. 다카라바이오는 FACS 실험을 위해서는 multi-channel pipette을 사용하여 다른 plate로 옮길 것을 권장합니다.

Q21 RetroNectin을 사용하여 virus가 도입된 세포를 plate로부터 resuspension하는 방법이 있나요?

예) Jurkat cell의 세포 표면 마커인 CD154와 CD69를 염색하여, Flow cytometry로 분석하고 싶은데, Trypsin을 사용하면 세포 표면 마커가 degradation 된다고 합니다.

Answer 21: HL60과 K562와 같은 cell line은 파이펫팅으로 쉽게 모이는 것을 확인하였습니다. 하지만, 일부 cell line의 경우 trypsin을 사용하지 않으면 모으는 것이 어렵습니다. Jurkat cell을 resuspend 하는 것은 다카라바이오에서 확인되지 않았습니다. 일반적으로, pipetting으로 세포를 모으는 것이 어렵다면, 도입 24시간 이후 trypsin을 처리하여 세포를 모으고, 새로운 dish로 옮기는 것을 추천합니다. 그리고, 이틀간 세포를 부유 상태로 배양한 후, Flow cytometry를 사용하여 부유 세포를 수집합니다.