



# 重组人纤维连接蛋白

货号: GX100A

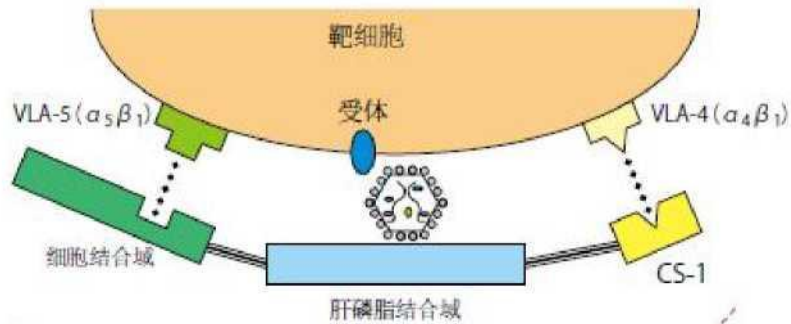
## 目录

一、产品概述 .....	1
二、产品组分 .....	2
三、储存条件 .....	2
四、需要但未提供的材料 .....	2
五、实验方案 .....	3
<b>【1.重组人纤维连接蛋白包被培养板的制备】</b> .....	3
<b>【2.基因转导】</b> .....	3
A.重组人纤维连接蛋白结合病毒感染方法 .....	4
B.上清液感染方法 .....	5

# 一、产品概述

该重组人纤维连接蛋白(rFN-CH-296),由三个功能结构域组成:细胞结合域、肝磷脂结合域和CS1位点。该重组人纤维连接蛋白通过协助靶细胞和病毒粒子的共定位来增强逆转录病毒介导的基因转导。其作用原理是:逆转录病毒载体与肝磷脂结合域结合,细胞表面VLA-5及VLA-4分别与该纤连蛋白的细胞结合域和CS-1位点结合。

在经重组人纤维连接蛋白包被的培养容器表面,细胞与病毒载体高浓度共存,从而提高基因感染效率。



两种感染方案:

1. 逆转录病毒与该重组人纤维连接蛋白包被的培养板结合, 去除逆转录病毒上清液后加入靶细胞。但去除上清液会减少抑制性分子(例如, 从生产细胞分泌的分子, 如蛋白聚糖、病毒包膜蛋白), 从而降低病毒介导的基因转导效率。
2. 细胞与病毒上清液混合并结合到重组人纤维连接蛋白包被的培养板上。

两种方案均可用于有效的基因转导。尽管方案 1 广泛适用, 但具体实验方案可能仍需根据靶细胞、载体、靶基因进行修改。

重组人纤粘连蛋白

0.5mg

## 二、产品组分

该试剂以 1 mg/ml 溶液形式提供。【含有 12.5 mM 柠檬酸钠（pH 6.2）和 1.25%蔗糖的无菌溶液。】

## 三、储存条件

-20℃

注意：（1）最多可冻融 10 次。

（2）不要剧烈混合溶液。不要涡旋。

## 四、需要但未提供的材料

设备：

未经处理的组织培养板或培养皿

电动移液器

移液器

无菌移液器

带滤芯的无菌吸头

生物安全柜或超净工作站

显微镜

二氧化碳培养箱

微孔板离心机

试剂：

无菌 PBS(-)

HBSS/Hepes (Hank's Balanced Salt 溶液, 添加 2.5% (v/v) 1 M Hepes)

2%牛血清白蛋白(BSA Fraction V) /PBS 溶液

## 五、实验方案

### 【1.重组人纤维连接蛋白包被培养板的制备】

将重组人纤维连接蛋白包被于培养板上,浓度 20-100  $\mu\text{g/ml}$  的重组人纤维连接蛋白可达到 4-20  $\mu\text{g/cm}^2$  的包被密度。

(1) 包被前, 用无菌 PBS 将该溶液稀释至 20-100  $\mu\text{g/ml}$ 。【请提前计算重组人纤粘连蛋白试剂的用量, 如: 2.25ml 浓度为 20 Ng/ml 的重组人纤粘连蛋白溶液放入直径为 35mm 的培养皿 ( $9\text{cm}^2$ ) 中时, 用于包被的密度为 5  $\mu\text{g/cm}^2$ 】

**注意:** 为避免重组人纤维连接蛋白丢失, 请勿将 PBS 稀释的重组人纤粘连蛋白溶液过滤除菌。

(2) 将适当体积(24 孔板中每孔 0.5 ml, 或 6 孔板每孔 2ml。) 的无菌重组人纤粘连蛋白溶液分配到每个板中, 让板在室温下静置 2 小时或在 4°C 过夜。

**注意:** 在此步骤中应使用未经处理的细胞培养级组织培养板或培养皿。

(3) 移除重组人纤粘连蛋白溶液, 然后用适量含无菌 2%牛血清白蛋白(BSA, Fraction V) 的 PBS 溶液进行封闭(24 孔板中每孔 0.5 ml, 或 6 孔板每孔 2 ml), 让板在室温下静置 30 分钟。

(4) 移除 BSA 溶液, 用适当体积的 HBSS/Hepes 或 PBS 清洗一次。除去洗涤液后, 即可使用。重组人纤维连接蛋白包被板可用封板膜密封, 并在 4°C 下储存一周。

### 【2.基因转导】

使用重组人纤维连接蛋白试剂进行基因转导的方法有两种:重组人纤维连接蛋白结合病毒感染法(A 方法)和上清液感染法(B 方法)。在 A 方法中, 逆转录病毒颗粒首先结合到涂有重组人纤粘连蛋白试剂的板上, 去除病毒上清液后加入靶细胞。在 B 方法中, 将病毒溶液和靶细胞混合, 然后添加到重组人纤维连接蛋白包被板中。

如果病毒溶液未经纯化直接用于病毒感染, 可能会因为污染导致基因转导效率降低。在这种情况下, 推荐使用 A 方法, 通过将病毒与重组人纤维连接蛋白试剂结合并去除上清液来去除抑制物。

## A.重组人纤粘连蛋白结合病毒感染方法

### A-1.病毒结合板制备（无需离心）

- 1 .将 125-250  $\mu\text{Pl}/\text{cm}^2$  的逆转录病毒上清液添加到涂有重组人纤维连接蛋白的培养板或培养皿中。
- 2 .在 5% $\text{CO}_2$  培养箱中 32°C 或 37°C 孵育 4 至 6 小时，使病毒颗粒与重组人纤粘连蛋白试剂充分结合。
- 3 .弃上清液，但不要让培板干燥。用适当体积的 PBS 或含有 0.1-2% 白蛋白（BSA 或 HSA）的 PBS 清洗，清洗后按 A-3 进行感染。

### A-2.离心法制备病毒结合板

- 4 果病毒滴度足够高，则病毒与重组人纤维连接蛋白试剂的结合无需离心即可完成，如 A-1 中所述。

但如果滴度较低，或者您需要更高的基因转导效率，则最好通过离心结合病毒。使用这种方法，结合逆转录病毒所需的时间显著减少（离心法 2 小时，非离心法 4-6 小时）。一块未经处理的细胞培养板，在 32°C 下可以承受 1,000-2,000g 离心 2 小时。此外，请注意有可能形成气溶胶。

- 1 .将 125-500  $\text{NI}/\text{cm}^2$  的逆转录病毒原液或稀释溶液添加到重组人纤维连接蛋白包被板中。

**注意:**可以添加到板中的体积会有所不同。对于 6 孔板，上限为 3 ml（320 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ）。在这种方法中，一些感染抑制分子可能无法通过用 PBS 洗涤而去除，可能会导致基因转导的效率降低。在这种情况下，建议将病毒原液稀释后使用生长培养基。需要优化以确定合适的稀释率。

- 2 .将板置于预热至 32°C 的离心机中，并在 32°C 1,000-2,000g 下离心 2 小时，以使病毒颗粒与重组人纤粘连蛋白试剂充分结合。
- 3 .弃上清液，但不要让板干燥。用适当体积的 PBS 或含有 0.1-2% 白蛋白（BSA 或 HSA）的 PBS 清洗，然后按照 A-3 进行病毒感染。

### A-3.病毒感染

在逆转录病毒颗粒与重组人纤维连接蛋白包被板结合时准备靶细胞。靶细胞处于对数生长期并表达整合素受体 VLA-4 和/或 VLA-5 至关重要。当使用造血干细胞时，可能需要用细胞因子进行预刺激，细胞因子类型应根据您的具体研究方案确定。

1. 收集目标细胞并计算活细胞的数量，然后以细胞浓度  $0.2-1 \times 10^5/\text{ml}$  将细胞悬浮在生长培养基中。
2. 从 A-1 或 A-2 制备的病毒结合板中去除洗涤液。不要让板干燥。立即加入密度为  $0.5-2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$  的靶细胞。虽然最佳细胞密度取决于细胞大小和生长速率，但初始细胞密度还是应使细胞转导后 2-3 天分析时能够积极生长或接近汇合。当感染更多细胞时，可能会增加细胞密度，但细胞在基因转导后需要传代培养。

**注意:**为了促进靶细胞和病毒颗粒之间的结合，可以在加入细胞后进行离心。

3. 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  的培养箱中孵育 2-3 天。

#### 4. 收集非贴壁和贴壁细胞:

- (1) 将上清液转移到离心管中。
- (2) 用 PBS 洗涤培养板，收集剩余的非贴壁细胞。
- (3) 按照制造商的说明，使用细胞解离缓冲液 (Thermo Fisher Scientific)、无酶溶液或胰蛋白酶-EDTA 从板上分离贴壁细胞。

**注意:**对许多细胞类型，只能通过移液器收集贴壁细胞。

- (4) 将步骤 (1) - (3) 中获得的细胞混合在同一管中，离心回收细胞。
- (5) 用 HBSS/Hepes 溶液洗涤细胞两次，并通过离心收集。如果还需进行进一步分析，可将细胞在 HBSS/Hepes 溶液重悬 (适用于细胞下游应用的任何缓冲液或培养基也可用于重悬)。

## B. 上清液感染方法

使用病毒原液时，推荐 A 方法，但如果稀释 4 倍及以上，A、B 方法都可以用，因为可获得等效的基因转导效率。此外，B 方法感染病毒所需的时间比 A 方法短很多。

1. 将靶细胞悬浮在已用生长培养基稀释的病毒溶液中以制备细胞悬液。
2. 将细胞悬液添加到重组人纤维连接蛋白包被板中，细胞密度为  $0.5-25 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。虽然最佳细胞密度取决于细胞大小和生长速率，但在转导后 2-3 天分析基因表达时，初始细胞密度应允许细胞积极生长或接近汇合。当感染更多细胞时，可能会增加细胞密度，但细胞在基因转导后需要传代培养。

**注意:**为了促进靶细胞和病毒载体的结合，可以在加入细胞后进行离心。

3. 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  的培养箱中培养 2-3 天。
4. 收集非贴壁和贴壁细胞:

- (1) 将上清液转移到离心管中。
- (2) 用 PBS 洗涤培养板，收集剩余的非贴壁细胞。
- (3) 按照制造商的说明，使用细胞解离缓冲液(Thermo Fisher Scientific)、无酶溶液或胰蛋白酶-EDTA 从板上分离贴壁细胞。

**注意:**对许多细胞类型，只能通过移液器收集贴壁细胞。

- (4) 将步骤(1)-(3)中获得的细胞混合在同一管中，离心回收细胞。
- (5) 用 HBSS/Hepes 溶液洗涤细胞两次，并通过离心收集。如果还需进行进一步分析，可将细胞在 HBSS/Hepes 溶液重悬 (适用于细胞下游应用的任何缓冲液或培养基也可用于重悬)。

**注意:**本产品仅用于研究，不可用于治疗或诊断。此外，请切勿将本产品用作食物、化妆品或家庭用品等。

官方网址: <http://www.genesion.com.cn>  
订货热线: 4006169114、020-84224925  
Email: whiga22@126.com

