

## BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment

产品编号	产品名称	包装
C0352-500µg	BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment	500µg
C0352-2mg	BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment	2mg
C0352-10mg	BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment	10mg

### 产品简介:

- 碧云天的BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (BeyoNectin™重组人纤维连接蛋白片段), 简称BeyoNectin™, 也称逆转录病毒感染及T细胞活化试剂(Retroviral Infection and T Cell Activation Reagent)或逆转录病毒感染增强试剂(Retroviral Infection Enhancing Reagent), 是一种重组人纤维连接蛋白片段, 可提高病毒感染细胞的效率、促进细胞贴壁和生长、增强体外T细胞的激活和扩增等。BeyoNectin™属于生物大分子, 与Polybrene (聚凝胺)和Protamine (鱼精蛋白)等病毒感染增强剂相比细胞毒性更低, 不影响病毒感染后细胞的增殖, 特别适合用于悬浮细胞、造血干细胞或其它病毒难感染的细胞[1, 2]。
- BeyoNectin™与Takara的RetroNectin® Recombinant Human Fibronectin Fragment (逆转录病毒感染及T细胞活化试剂)(T100)等系列产品提高病毒感染效率的原理和使用方法基本一致。
- 本重组人纤维连接蛋白片段包含三个功能区: Cell-binding domain (C-Domain), Heparin-binding domain (H-Domain)和CS-1 sequence (CS-1), 其中C-Domain和CS-1分别能特异性结合细胞表面的VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ )和VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ), H-Domain能结合慢病毒(Lentivirus)或逆转录病毒(Retrovirus)。BeyoNectin™包被于细胞培养容器表面后可通过共定位的方式促进细胞和病毒的结合, 从而提高病毒感染细胞的效率。BeyoNectin™促进病毒感染的原理图请参考图1。

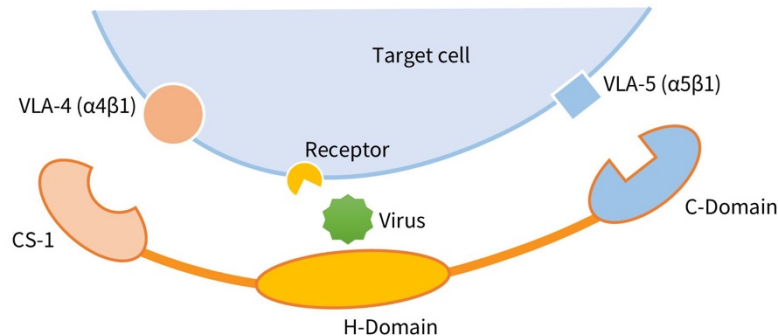


图1. 碧云天BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (C0352)促进病毒感染的原理图。

- **BeyoNectin™对表达整合素VLA-4或VLA-5的细胞有促进病毒感染的作用。**表达VLA-4的细胞包括: T细胞、B细胞、单核细胞、NK细胞、嗜酸性粒细胞、骨髓单核细胞和淋巴祖细胞等;表达VLA-5的细胞包括: 胸腺细胞、活化T细胞和肥大细胞等。BeyoNectin™能有效促进病毒感染细胞系, 例如Jurkat、K-562、HL-60和NIH/3T3等细胞系; 也能有效促进病毒感染原代细胞, 例如CD34<sup>+</sup>骨髓细胞、骨髓源性单核细胞、人造血干细胞、人脂肪源性干细胞和人间充质干细胞等。
- **BeyoNectin™能促进泛嗜型(VSV-G)、单嗜型(Ecotropic)和兼嗜型(Amphotropic)包膜的慢病毒和逆转录病毒感染细胞, 也适用于GALV包膜的逆转录病毒感染细胞。**
- **BeyoNectin™增强感染效果好。**BeyoNectin™与国外同类产品Competitor T促进慢病毒感染Jurkat、K-562和HL-60细胞系的效果请参考图2。

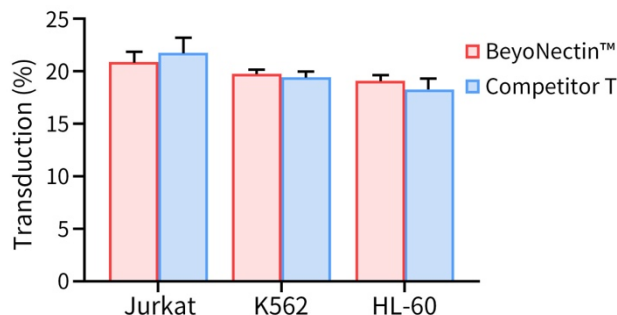


图2. 碧云天BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (C0352)促进慢病毒感染细胞的效果图。在细胞培养容器表面分别包被BeyoNectin™和Competitor T, 然后用Lenti-EF1 $\alpha$ -mCherry ( $10^8$ TU/ml, 对照慢病毒)(C4019)分别感染

Jurkat、K-562和HL-60细胞，48小时后通过流式细胞仪检测红色荧光表达测定细胞感染效率(Transduction)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **BeyoNectin™可增强多种细胞贴壁。** BeyoNectin™可辅助细胞贴壁，维持良好生长状态，提高细胞生长效率，也可增加悬浮细胞单克隆筛选的效率。本产品促进悬浮细胞贴壁，防止细胞聚团的效果请参考图3。

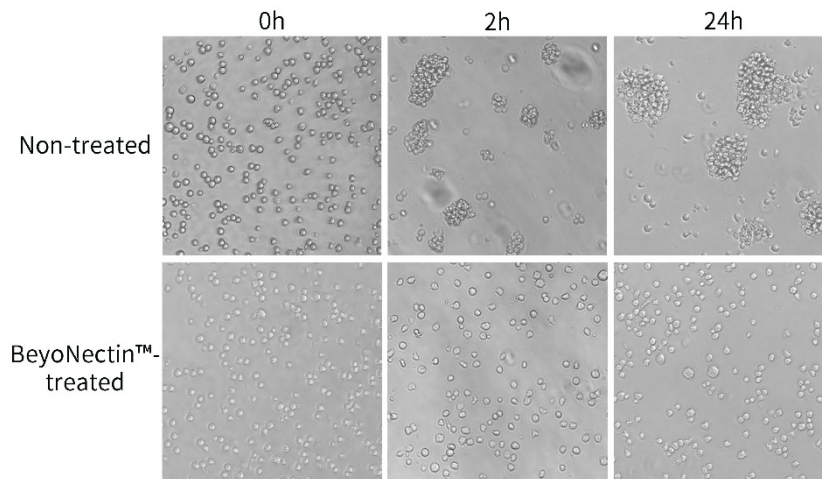


图3. 碧云天BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (C0352)促进细胞贴壁的效果图。分别使用普通细胞培养皿(Non-treated)和BeyoNectin™包被的细胞培养皿(BeyoNectin™-treated)培养Jurkat悬浮细胞，使用显微镜观察细胞在0小时、2小时和24小时的贴壁效率，BeyoNectin™可使Jurkat悬浮细胞有效贴壁，防止细胞聚团。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **BeyoNectin™与CD3抗体等联用可增强体外T细胞的激活和扩增。** 近些年，重组人纤维连接蛋白片段已广泛用于T细胞受体工程化T细胞(T cell receptor-engineered T cells, TCR-T)和嵌合抗原受体T细胞(Chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)的制备[2, 3]。与单独使用CD3抗体相比，同时使用重组人纤维连接蛋白片段后能更有效的刺激T细胞扩增，T细胞分化为记忆T细胞的能力也更强[4]。BeyoNectin™和Recombinant Anti-CD3 Antibody (OKT3)联用激活T细胞的效果请参考图4。

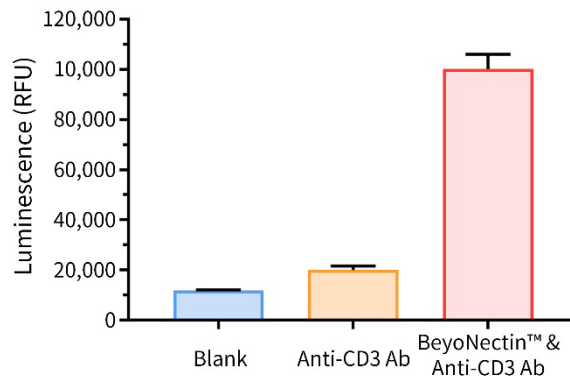


图4. 碧云天BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (C0352)增强T细胞激活的效果图。单独使用Recombinant Anti-CD3 Antibody (OKT3)，或同时使用BeyoNectin™和Recombinant Anti-CD3 Antibody (OKT3)，刺激TCR/CD3 Effector Cells (NFAT) 6小时，通过检测荧光素酶报告基因的表达情况评估T细胞激活效率。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **蛋白浓度(Concentration):** 1mg/ml。
- **储存液(Storage buffer):** 12.5mM Sodium citrate (pH6.2), 1.25% Sucrose。
- 对于96孔板，按照每孔使用0.1ml BeyoNectin™工作液进行包被，当BeyoNectin™工作液浓度为20μg/ml时，每1ml本产品，可以用于5块96孔板的包被；当BeyoNectin™工作液浓度为100μg/ml时，每1ml本产品，可以用于1块96孔板的包被。

**包装清单：**

产品编号	产品名称	包装
C0352-500μg	BeyoNectin™ rhFibronectin Fragment (1mg/ml)	500μl
C0352-2mg	BeyoNectin™ rhFibronectin Fragment (1mg/ml)	2ml
C0352-10mg	BeyoNectin™ rhFibronectin Fragment (1mg/ml)	2ml×5
—	说明书	1份

**保存条件：**

-20°C保存，一年有效。-80°C保存，可以保存更长时间。

## 注意事项:

- 必须使用**表面未经处理的细胞培养容器(Non-treated tissue cell culture vessel)**进行包被, 不能使用表面处理的细胞培养容器(Treated tissue cell culture vessel), 即**不能使用最常用的细胞培养器皿**进行包被。表面处理的细胞培养容器结合BeyoNectin™的能力较低, 因此会降低BeyoNectin™促进病毒的感染细胞的效率。推荐碧云天的96孔板(平底, 带盖) (FPT010/FPT011)、6厘米或9厘米培养皿(无菌) (FDSH106/FDSH109)。
- 经测试, 反复冻融10次基本不影响BeyoNectin™的活性。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. BeyoNectin™用于提高病毒感染细胞的效率。

#### (1) BeyoNectin™提高病毒感染细胞效率的使用方法建议。

BeyoNectin™提高病毒感染细胞效率的使用方法有2种: BeyoNectin™-bound virus (BBV)法和Supernatant infection (SNI)法。

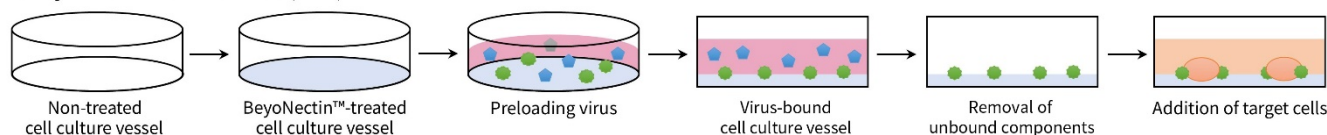
**a. BBV法:** 是指先将病毒溶液加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中, 病毒先与BeyoNectin™特异性结合, 通过洗涤去除未结合的组分, 然后再加入靶细胞进行病毒感染(图5A)。

**b. SNI法:** 是指将病毒溶液与靶细胞直接混合后, 加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中(图5B)。

注1: 未经纯化的病毒, 推荐使用BBV法, 因为未经纯化的病毒溶液中可能含有降低病毒感染细胞效率的物质。

注2: 如果是浓缩后的病毒, 推荐使用BBV法; 如果浓缩后的病毒需要稀释4倍以上使用, 则BBV法和SNI法促病毒感染效率相同, 但SNI法更简单, 耗时也更少。

#### A. BeyoNectin™-bound virus (BBV)



#### B. Supernatant infection (SNI)

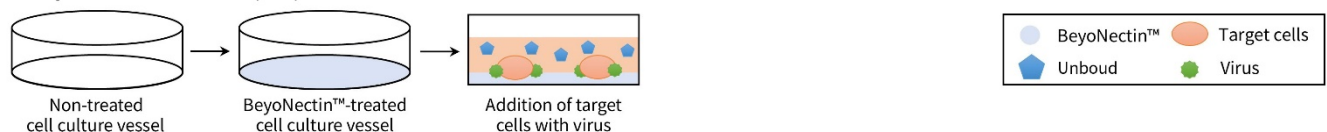


图5. 碧云天BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment (C0352)使用方法流程图。

#### (2) BeyoNectin™包被未表面处理的细胞培养容器(Non-treated tissue cell culture vessel)。

**a. 准备BeyoNectin™工作液。** BeyoNectin™工作液的推荐浓度为20-100μg/ml (对应于孔板的有效面积约4-20μg/cm<sup>2</sup>), 不同细胞培养容器的用量可参考下表。推荐使用PBS (pH7.4, Low Endotoxin, Cell Culture Grade) (C0221B)对BeyoNectin™进行稀释。

Non-treated tissue cell culture vessel	Actual area (cm <sup>2</sup> )	Coat/Block/Wash volume (ml)	BeyoNectin™ (μg)
96-well plate	~0.32	0.1	2-10
48-well plate	~1.1	0.2	4-20
24-well plate	~1.9	0.5	10-50
12-well plate	~3.5	1	20-100
6-well plate	~9.6	2	40-200
35mm dish	~8.8	2	40-200
60mm dish	~21.5	5	100-500
100mm dish	~56.7	10	200-1000
150mm dish	~145	15	300-1500
T-25 flask	~25	3	60-300
T-75 flask	~75	8	160-800
T-175 flask	~175	15	300-1500

注1: 此步骤需要无菌操作, 推荐在生物安全柜或超净工作台中进行。

注2: BeyoNectin™的工作液浓度和用量可根据具体实验自行优化。

**b. BeyoNectin™包被细胞培养容器。** 将适当体积的BeyoNectin™工作液加入到**表面未处理的**细胞培养容器中, 室温孵育2小时或4℃孵育过夜。推荐碧云天的96孔板(平底, 带盖) (FPT010/FPT011)、6厘米或9厘米培养皿(无菌) (FDSH106/FDSH109)。

c. **封闭。** 去除上清，将合适体积的封闭液(2% BSA Fraction V in PBS)加入细胞培养容器中，室温孵育30分钟，去除上清。  
注：封闭液需要预先过滤除菌，推荐使用BeyoGold™针头滤器(0.22μm/33mm, PES, Sterile) (FF362)。

d. **洗涤。** 将合适体积的PBS加入细胞培养容器中，清洗一次，去除上清。

注：如果不立刻使用，可以用BeyoGold™封板膜(透明，自粘型，PP) (FSF030)或Parafilm封口膜(4英寸×125英尺) (FPF566)封闭细胞培养容器，置于4°C保存，一周有效。不能置于-20°C保存。

### (3) 准备病毒工作液。

用细胞培养液将病毒稀释到合适浓度，不同细胞培养容器需要病毒工作液的体积(Virus volume)、细胞接种密度(Seeding density)可参考下表。

BeyoNectin™-treated cell culture vessel	Seeding density (cells)	Virus volume (ml)	Wash volume (ml)
96-well plate	1.6-8×10 <sup>3</sup>	0.05	0.1
48-well plate	0.55-2.75×10 <sup>4</sup>	0.1	0.2
24-well plate	0.95-4.75×10 <sup>4</sup>	0.25	0.5
12-well plate	1.75-8.75×10 <sup>4</sup>	0.5	1
6-well plate	4.8-24×10 <sup>4</sup>	1	2
35mm dish	4.4-22×10 <sup>4</sup>	1	2
60mm dish	1.1-5.3×10 <sup>5</sup>	2.5	5
100mm dish	2.8-14.1×10 <sup>5</sup>	5	10
150mm dish	7.2×10 <sup>5</sup>	7.5	15
T-25 flask	7×10 <sup>5</sup>	1.5	3
T-75 flask	2.1×10 <sup>5</sup>	4	8
T-175 flask	4.9×10 <sup>5</sup>	7.5	15

注1：如果病毒滴度较高，可用细胞培养液稀释到合适浓度。

注2：具体接种数量需根据细胞种类、细胞大小和细胞生长速度等因素而确定。最佳接种数量通常为培养2-3天后细胞汇合度达到90-100%。

### (4) BeyoNectin™-bound virus (BBV)法。

BBV法根据病毒结合BeyoNectin™的过程中是否离心，分为BBV不离心法和BBV离心法。BBV离心法能够有效促进病毒与BeyoNectin™结合，因此BBV离心法比BBV不离心法感染细胞的效率更高，建议采用BBV离心法。

#### a. BBV离心法(二选一，更推荐使用)。

(a) 将合适体积的病毒工作液加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中。

(b) 离心。离心机预热到32°C，1,000-2,000×g离心2小时。

(c) 洗涤。去除上清，立刻加入合适体积的PBS清洗一次。

注：不要使细胞培养容器内表面干涸。

#### b. BBV不离心法(二选一)。

(a) 将合适体积的病毒工作液加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中。

(b) 孵育。32或37°C细胞培养箱孵育4-6小时。

(c) 洗涤。去除上清，立刻加入合适体积的PBS清洗一次。

注：不要使细胞培养容器内表面干涸。

#### c. 病毒感染靶细胞。

在步骤(4) a (b)或(4) b (b)进行中准备待病毒感染的靶细胞，使用处于指数增长期、状态良好的靶细胞对病毒感染效率至关重要。造血干细胞可能需要提前使用细胞因子进行刺激，细胞因子的类型和用量请根据实验需要使用。

(a) 收集细胞，对细胞进行计数，根据不同细胞培养容器将靶细胞稀释到合适浓度。

注：具体的细胞接种数量需根据细胞种类、细胞大小和细胞生长速度等因素确定。最佳接种数量通常为培养2-3天后细胞汇集度达到90%-100%。

(b) 步骤(4) a (c)或(4) b (c)，去除上清后，立刻将合适体积的靶细胞加入到含有病毒的细胞培养容器中。

注：不要使细胞培养容器内表面干涸。

(c) 离心机预热到32°C，1,000-2,000×g离心1小时。

(d) 37°C，5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育2-3天后，根据实验需要进行下一步操作。

### (5) Supernatant infection (SNI)法。

使用处于指数增长期、状态良好的靶细胞对病毒感染效率至关重要。造血干细胞可能需要提前使用细胞因子进行刺激，细胞因子的类型和用量请根据实验需要使用。

a. 收集细胞，对细胞进行计数，根据不同细胞培养容器将靶细胞稀释到合适浓度。

注：具体的细胞接种数量需根据细胞种类、细胞大小和细胞生长速度等因素确定。最佳接种数量通常为培养2-3天后细胞汇集度达到90%-100%。

b. 靶细胞，1,000-2,000×g离心5分钟，去除上清。



- c. 合适体积的病毒工作液重悬靶细胞，加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中。
- d. 离心机预热到32°C，1,000-2,000×g离心1小时。
- e. 37°C，5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育2-3天后，根据实验需要进行下一步操作。

## 2. BeyoNectin™促进细胞贴壁。

- a. 按照步骤1 (2)准备BeyoNectin™包被的细胞培养容器。
- b. 用合适的培养液将细胞稀释到合适浓度，加入到BeyoNectin™包被的细胞培养容器中。
- c. 离心机预热到32°C，1,000-2,000×g离心5分钟。
- d. 37°C，5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育2-3天后，根据实验需要进行下一步操作。

## 3. BeyoNectin™与CD3抗体联用增强体外T细胞的激活和扩增。

- a. **准备BeyoNectin™和CD3抗体工作液。** BeyoNectin™和CD3抗体工作液的推荐浓度为20-100μg/ml(对应于孔板的有效面积约4-20μg/cm<sup>2</sup>)，不同细胞培养容器的用量可参考下表。推荐使用PBS (pH7.4, Low Endotoxin, Cell Culture Grade) (C0221B)对BeyoNectin™和CD3抗体进行稀释。

Non-treated tissue cell culture vessel	Actual area (cm <sup>2</sup> )	Coat/Block/Wash volume (ml)	BeyoNectin™ (μg)	Anti-CD3 Antibody (μg)
96-well plate	~0.32	0.1	2-10	2-10
48-well plate	~1.1	0.2	4-20	4-20
24-well plate	~1.9	0.5	10-50	10-50
12-well plate	~3.5	1	20-100	20-100
6-well plate	~9.6	2	40-200	40-200
35mm dish	~8.8	2	40-200	40-200
60mm dish	~21.5	5	100-500	100-500
100mm dish	~56.7	10	200-1000	200-1000
150mm dish	~145	15	300-1500	300-1500
T-25 flask	~25	3	60-300	60-300
T-75 flask	~75	8	160-800	160-800
T-175 flask	~175	15	300-1500	300-1500

注1：此步骤需要无菌操作，推荐在生物安全柜、细胞超净工作台中进行。

注2：BeyoNectin™和CD3抗体工作液浓度和用量可根据具体实验自行优化。

- b. **BeyoNectin™和CD3抗体包被细胞培养容器。**将合适体积的BeyoNectin™和CD3抗体工作液加入到**表面未处理**的细胞培养容器中，室温孵育2小时或4°C孵育过夜。推荐碧云天的96孔板(平底，带盖) (FPT010/FPT011)、6厘米或9厘米培养皿(无菌) (FDSH106/FDSH109)。
- c. **封闭。**去除上清，将合适体积的封闭液(2% BSA Fraction V in PBS)加入细胞培养容器中，室温孵育30分钟，去除上清。  
注：封闭液需要过滤除菌，推荐使用BeyoGold™针头滤器(0.22μm/33mm, PES, Sterile) (FF362)。
- d. **洗涤。**将合适体积的PBS加入细胞培养容器中，清洗一次，去除上清。  
注：如果不立刻使用，可以用BeyoGold™封板膜(透明，自粘型, PP) (FSF030)或Parafilm封口膜(4英寸×125英尺) (FPF566)封闭细胞培养容器，置于4°C保存，一周有效。不能置于-20°C保存。
- e. **T细胞的激活和扩增。**
  - (a) 用合适的培养液将T细胞稀释到合适浓度，加入到BeyoNectin™和CD3抗体包被的细胞培养容器中。  
注：T细胞扩增需要加入的Recombinant human IL-2，具体用量可参考相关文献。
  - (b) 离心机预热到32°C，1,000-2,000×g离心5分钟。
  - (c) 37°C，5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育2-3天后，根据实验需要进行下一步操作。

## 参考文献：

1. Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, et al. J Biochem. 1991. 110(2):284-91.
2. Nasiri F, Muhammadnejad S, Rahbarizadeh F. Clin Exp Med. 2023. 23(6):2535-2549.
3. Stock S, Hoffmann JM, Schubert ML, Wang L, Wang S, et al. Hum Gene Ther. 2018. 29(10):1167-1182.
4. Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, et al. Eur J Immunol. 2014. 44(6):1747-58.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0351-1ml	Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	10mg/ml×1ml
C0351-50mg	Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	50mg
C0352	BeyoNectin™ Recombinant Human Fibronectin Fragment	500μg/2mg/10mg
C2901S	通用型病毒浓缩试剂盒	可用于150ml
C2901M	通用型病毒浓缩试剂盒	可用于600ml

C2901L	通用型病毒浓缩试剂盒	可用于3L
ST1380	Polybrene ( $\geq 94\%$ , Reagent grade)	500mg/2g/10g

Version 2025.02.27