

AMMS[®] CD3/CD28 单抗偶联磁珠说明书

产品名称

通用名称：AMMS[®]CD3/CD28 单抗偶联磁珠

英文名称：AMMS[®]Anti-human CD3/CD28 beads for T cell

适用范围

AMMS[®]CD3/CD28 单抗偶联磁珠适用于人 T 细胞的分离、激活和扩增。适用于 CAR-T 等多种 T 细胞培养技术的应用。

产品信息

货 号	GMP-TL601	适用范围	T 淋巴细胞
浓 度	2×10 ⁸ beads/ml	反应种属	人
含 量	1ml	保存温度	2~8℃
内毒素	<2EU/ml	有 效 期	24 个月

作用机理

AMMS[®] CD3/CD28 单抗偶联磁珠提供了一种不需要抗原呈递细胞和抗原就能激活和扩增调节 T 细胞的简单的方法。通过在磁珠上偶联抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体，就能提供调节 T 细胞激活和扩增需要的初级和协同刺激信号。

使用说明

一、AMMS[®] CD3/CD28 单抗偶联磁珠的清洗：

- 1.1 在离心管里重悬磁珠（涡旋超过30s，或者颠倒混匀5min）；
- 1.2 将确定体积的磁珠转移到离心管中；
- 1.3 加入等体积的PBS缓冲液(含1%HSA)，若磁珠体积低于1ml 则加1ml PBS缓冲液(含1%HSA)，进行重悬；
- 1.4 把离心管放在磁力架（磁珠专用）上 1min，随后弃去上清；
- 1.5 将离心管从磁力架（磁珠专用）上转移下来，用相同体积的 PBS 缓冲液(含 1%HSA)重悬磁珠（第二步最初体积的磁珠）。

二、磁珠分离和扩增 CD3⁺ 的 T 细胞

- 2.1 对于 Ficoll 分离的 PBMC，将细胞轻柔的重悬于 PBS 缓冲液(含 1%HSA)中，并调节细胞密度为 2~5×10⁷ 个/ml，此处注意，总的细胞数量不要超过 2×10⁸ 个。
- 2.2 将磁珠和细胞按照 3:1 的比例混合(如果需要活化的细胞是纯 T 细胞，那么磁珠与细胞的比例调整为 1:1)。
- 2.3 将样品置于转速 100~200 rpm/min 摇床上，在 4℃~25℃条件下孵育 30min，在每次的试验中需要在 4℃~25℃范围内优化最适的孵育条件。
- 2.4 用无血清培养基或者 PBS 缓冲液(含 1%HSA)稀释磁珠和细胞的混合物，来保证磁力架（磁珠专用）的分选体积。同时将离心管放在磁力架（磁珠专用）上 1~2min。
- 2.5 弃上清，将含有 1000 IU/ml IL-2 的完全培养基重悬磁珠和细胞的混合物，并调整细胞密度为 0.5×10⁶ 个/ml~1×10⁶ 个/ml。
- 2.6 将细胞悬液置于培养容器中，调节细胞密度为 0.5~1×10⁶/ml，随后将培养容器置于 37℃，5%CO₂ 的培养箱中，培养 7 天。

三、细胞计数和培养体系的扩增：

- 3.1 细胞扩增后期定期轻轻的吹打培养容器中的细胞悬液，以便将磁珠和细胞分离。吹打过程要确保能够分散所有可见的磁珠与细胞的混合物。
- 3.2 当 CD3⁺ T > 1×10⁶ 个/ml，补加含有 IL-2 的 T 细胞完全培养基稀释细胞，调整细胞密度大约为 0.5×10⁵ 个/ml。
- 3.3 在培养的最后几天（9~14 天），进行细胞计数，并用磁铁或磁力架去除磁珠。

注意事项

1. 由于单核细胞在 37℃能够快速吞噬磁珠，因此就降低了所能够接触到 T 细胞磁珠的绝对数量，进而降低了 T 细胞活化和扩增的能力。

2. 培养过程中，可以每天都进行细胞计数。同时通过流式细胞术对 T 细胞的纯度、表型、活化状态进行追踪。同时，收集培养上清进一步对 T 细胞活化状态进行细胞因子分泌的检测。
3. 若需要转染，一般在细胞活化的第 3~4 天，细胞活率在 90%以上进行转染。

参考文献

- 1、David M Barrett, Nathan Singh, Xiaojun Liu, Shuguang Jiang, Carl H June, Stephan A Grupp, Yangbing Zhao (2014). Relation of clinical culture method to T-cell memory status and efficacy in xeno graft models of adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 16(5):619-30.
- 2、Barbara Tumaini, Daniel W Lee, Tasha Lin, Luciano Castiello, David F Stroncek, Crystal Mackall, Alan Wayne, Marianna Sabatino. (2013). Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. *Cytotherapy* 15:1406-1415.