

NKG2D CAR-T 现货慢病毒

使用说明书

Cat.No. HG-CT002

目录 | CONTENTS

1. 产品简介	3
2. 应用.....	4
3. 产品规格	4
4. 存储.....	4
5. 生物安全	4
6. 需要准备的试剂、耗材与设备	4
7. 操作步骤	5
8. 故障排除	6
9. 买方须知	7



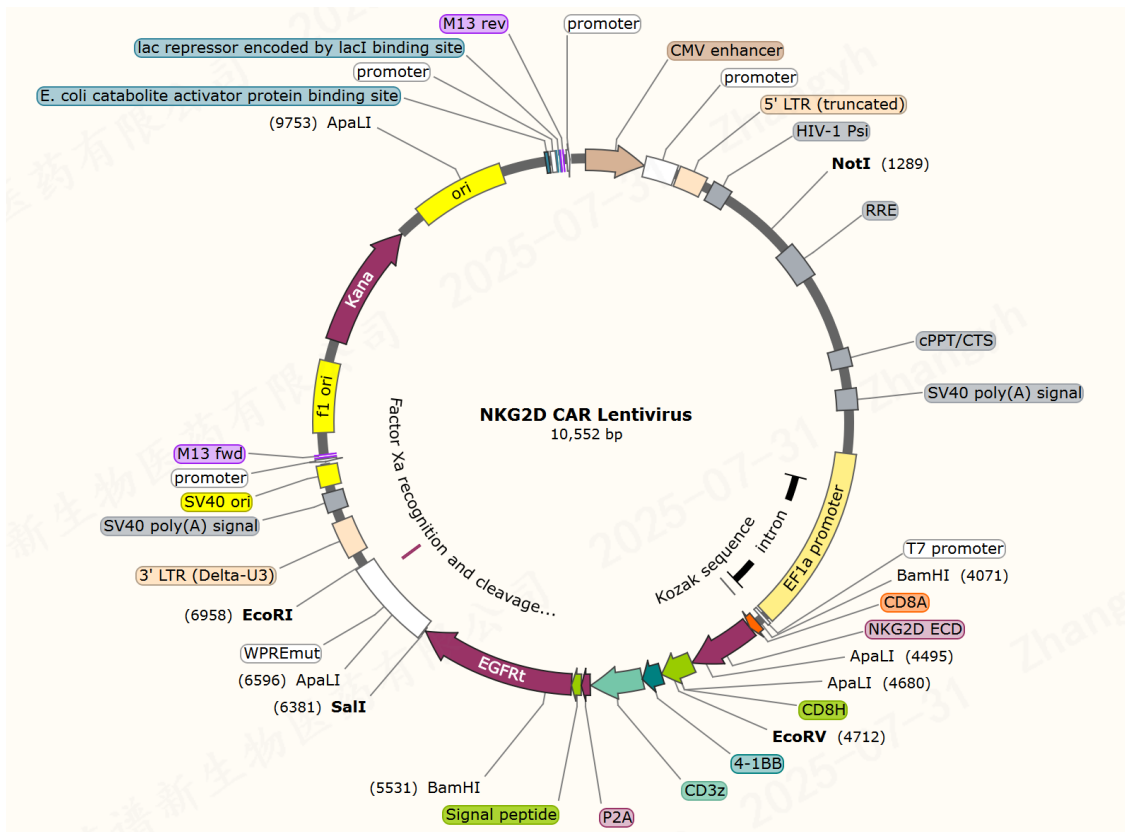
1. 产品简介

NKG2D (Natural Killer Group 2D) 是 C 型凝集素样激活受体, 由 KLRK1 基因编码, 以同源二聚体形式表达于 NK 细胞、CD8 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞等表面。NKG2D 胞内域无信号功能, 需通过衔接蛋白 DAP10 传递激活信号, 激活 PI3K 通路, 促进免疫细胞杀伤活性和细胞因子释放。NKG2D 配体在超过 80% 的实体瘤和血液瘤中上调 (如肝癌、AML), 且同一肿瘤内不同亚群细胞常共表达多种配体, 显著降低抗原丢失导致的免疫逃逸。衰老细胞高表达 MICA/MICB, 使 NKG2D CAR-T 可选择性清除衰老细胞, 改善年龄相关疾病。

谱新生物基于 CAR-T 技术开发了一款具有特异性杀伤功能并且方便鉴定感染效率的 NKG2D CAR-T 现货慢病毒, 该病毒使用 **VSV-G 包膜蛋白**, 可以转导大多数哺乳动物细胞, 包括原代细胞和非分裂细胞。病毒采用第二代 CAR 结构设计, 连接有 NKG2D ECD, 含有 CD8 铰链、4-1BB 同刺激结构域和 CD3z 信号结构域, 能够使 CAR-T 细胞的存活时间更长并能促进细胞的增殖, 且进行了 **Kana** 抗性的改造, 使其能够满足国内外法规政策的要求。

该病毒使用谱新平台无血清悬浮包装体系和下游慢病毒纯化体系 (**293T 细胞系**), 生产出高病毒滴度、低杂质含量的高质量 NKG2D CAR-T 现货慢病毒产品。通过此产品, 客户不仅可以跳过复杂繁琐的慢病毒载体制备进行**细胞工艺的摸索和验证**, 同时也能使用此产品**指导细胞工艺开发**, 加速开发流程。

A



B

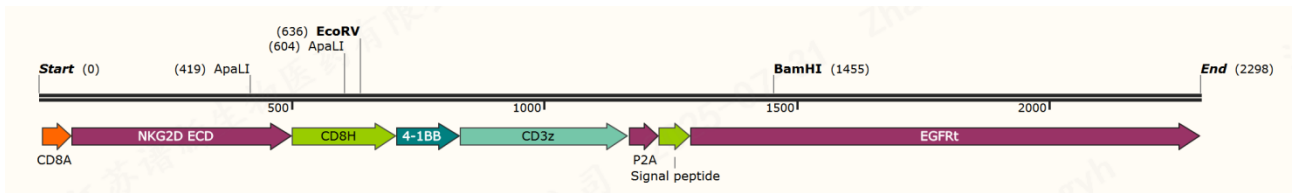


图 1 (A) 用于产生抗 NKG2D CAR 慢病毒的 lenti-vector 的示意图, 该载体含有卡那霉素的抗性基因。(B) 显示抗 NKG2D CAR 组分的结构图。

2. 应用

病毒转导优化实验。

生成 NKG2D CAR-T 细胞 (仅用于研究用途, 不用于治疗目的)。

3. 产品规格

产品名称	产品货号	规格	效期	存储
NKG2D CAR-T 现货慢病毒	HG-CT002	0.5mL/支	24 个月	-80°C

△注意: 在开始实验前, 请仔细阅读说明书, 并检查产品信息。

4. 存储

慢病毒与干冰一起运输。为了长期储存, 建议将病毒储存在-80°C。避免反复冻融循环。滴度可能随着每次冻融循环而显著下降。

△注意: NKG2D CAR-T 现货慢病毒避免反复冻融使用。

5. 生物安全

HIV 相关基因 (gag, pol, rev) 都不会在转导细胞中表达, 它们是由缺乏包装信号的包装质粒表达的。尽管慢病毒复制能力低下, 但它们需要使用**生物安全二级设施**。为了您的安全和健康, 操作时请穿实验服、戴手套、做好眼睛及面部防护, 避免慢病毒产品直接接触皮肤及眼睛。如果本产品发生吸入、吞食、接触皮肤、眼睛或者衣服, 请立即处理并彻底清洗。

6. 需要准备的试剂、耗材与设备

实验前请准备好下列试剂、耗材与设备:

- ◆ A2 型生物安全柜
- ◆ 二氧化碳培养箱
- ◆ 各规格移液器 (如 1000μL, 200μL, 10μL 等)
- ◆ 医用低温冰箱
- ◆ 细胞计数仪
- ◆ 电热恒温水浴锅
- ◆ 1000 μL, 200 μL, 10μL 等低吸附枪头

- ◆ PBMC
- ◆ T 细胞培养基
- ◆ T 细胞激活试剂 (Anti-human CD28 mAb、Anti CD3 mAb)
- ◆ T 细胞转导增强剂
- ◆ CD3 细胞分选磁珠/分选柱
- ◆ 人白介素-2

7. 操作步骤

7.1. 流程图



7.2. 操作步骤

7.2.1.T 细胞完全培养基配制：按照 1 L T 细胞基础培养基+1 mL 40 万 IU/mL IL-2 储备液（终浓度 **400 IU/mL**）。

△注意：为保证 CAR-T 细胞扩增效果，每次使用前需将配制好的完全培养基进行 37°C 预热。

7.2.2.D0 操作步骤：

PBMC 复苏：37°C 水浴复苏 PBMC，加入 5-10 倍体积的预热复苏培养基清洗 PBMC，400g、8min 离心后弃上清，再以预热的完全培养基重悬后均匀后取样进行 AO/PI 计数。

T 细胞分选：将复苏后 PBMC 进行 CD3 磁珠阳选，收集分选后的 T 细胞。

T 细胞激活：根据计数结果通过 5 mL 移液管取 4-5E7 待激活的 T 细胞于 15 mL 离心管，盖上离心管盖子，小心转移至离心机对应适配器内，配平后进行常温 400g、10min 升速 8、降速 8 离心。T 细胞离心结束后，通过 5 mL 移液管吸弃干净上清，以 10 mL 移液管吸取完全培养基重悬细胞，**调整活细胞密度 1.5E6/mL**，并将 T 细胞液转至 T75 培养瓶。根据 T 细胞激活体积，加

入所需量的 T 细胞激活试剂（**推荐 T 细胞激活试剂使用浓度为 500 ng/mL**）。以 10 mL 移液管吹打混匀后，盖紧 T75 培养瓶盖，于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱中激活培养 24±2 h。

7.2.3.D1 病毒转导操作步骤：

从培养箱中取出 24±2h 激活的细胞，生物安全柜内打开 T75 培养瓶盖子，以 10 mL 移液管吹打混匀，以 200 uL 移液枪头吸取 150 uL 细胞于 1.5 mL 离心管，进行细胞计数。

取出冻存的慢病毒和 **Viral E-hancer B (T 细胞转导增强剂 B)**，于 2-8°C 环境中避光解冻。待融化完全后，无尘布擦拭并进行表面消毒后传入生物安全柜内，打开慢病毒和 **Viral E-hancer B** 包装管盖子，根据计数结果按照 **MOI (MOI 的建议范围为 0.5-2)** 和慢病毒滴度通过 200µL 枪头加入所需量的慢病毒（需添加病毒体积µL=待转导细胞总量*MOI÷病毒滴度 IU/mL*1000），然后通过 1 mL 枪头加入所需量的 **Viral E-hancer B**（按照转导增强剂：细胞悬液的体积=1:100 加入 **Viral E-hancer B**）。以 10 mL 移液管吹打混匀后，盖紧 T75 培养瓶盖，于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱中静置转导 24±2h。

△注意：细胞吹打混匀过程中，操作应保持轻柔，防止因吹打力量过大造成细胞死亡比例过高。本说明中的用量为建议用量，用户可根据自身工艺情况进行用量梯度摸索。病毒转导方式为建议步骤，用户可根据自身工艺情况进行选择。

7.2.4.D2 补液培养：

据计数结果通过 10 mL 移液管吸取补加完全培养基，调至活细胞密度 **5E5/mL**，并根据细胞体积，选择合适的培养容器（如体积超过 50 mL，选用 T175 培养瓶），盖紧培养瓶盖，于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱培养。

7.2.5.D5 补液培养

据计数结果补加完全培养基，调至活细胞密度 **5E5/mL**，并根据细胞体积，选择合适的培养容器（如细胞培养袋），于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱培养。

7.2.6.D8 补液培养：

据计数结果补加完全培养基，调至活细胞密度 5E5/mL，并根据细胞体积，选择合适的培养容器（如细胞培养袋），于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱培养。

7.2.7.D10 细胞收获：

观察细胞，取样计数，收获细胞，若因实验需要，可适当提前或推后收获细胞使用或进行冻存。

△注意：本 CAR-T 细胞培养步骤仅做参考，由于样品个体差异、培养方式调整等因素，CAR-T 细胞扩增培养状态可能存在差异性，此时对 CAR-T 细胞生长状况观察分析后可进行适当调整。

8. 故障排除

问题	可能的原因	解决办法
细胞活率低于 80%	起始细胞活率不佳，分选出的 T 细胞状态不好，导致细胞在后续激活，转导等工艺中活率较低	若在转导前，细胞活率低于 70%，建议更换细胞，重新测试，以免影响后续测试表现和结果。
	病毒转导过程中，由于需要穿透细胞膜进入细胞核内，该过程会对细胞造成一定的损伤，属于正常现象	继续观测培养，一般情况下，在病毒转导后第二天，细胞活率会有不同程度的下降

		降，活率一般在 60%~85%，从第三天开始，细胞会慢慢恢复，活率开始上升。
	病毒本身的毒性	由于病毒包装制备工艺，序列设计等原因，可能导致病毒毒性较大，对细胞损伤较强，可以考虑优化序列或病毒制备工艺。
	细胞培养体系有待优化，	由于培养体系未能提供足够的营支持细胞的恢复与增殖，因此需要对培养体系进行优化和摸索。

9. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

未经我们事先书面批准，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 <https://www.hillgene.com> 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 <https://www.hillgene.com>。

附件 1: 相关产品 (更多产品可咨询谱新生物 <https://www.hillgene.com>)

产品名称	产品货号
血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒	HG-NA100
CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-CA001
RCL(VSVG) 基因拷贝数检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-RC001
支原体 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法)	HG-CL200
支原体 DNA 检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-ZY002
Viral E-hancer B	HG-PTD001-B
CD19 CAR-T 现货慢病毒	HG-CT1901
CD19 CAR-NK 现货慢病毒	HG-CN1901
NKG2D CAR-T 现货慢病毒	HG-CT002
IL15-CD19 现货慢病毒	HG-CN02-IL15
IL15 现货慢病毒	HG-CN1501
HIV-1 p24 ELISA 检测试剂盒	HG-P001
人干扰素 γ (IFN- γ) ELISA 检测试剂盒	HG-IF001
细胞杀伤检测试剂盒 (悬浮靶细胞)	HG-CKK001

让细胞药物
谱写生命新篇章

/
CELL THERAPY
INNOVATION INSPIRED



Hillgene

欢迎订购

江苏谱新生物医药有限公司

地 址：苏州市吴中大道1463号越旺智慧谷4号楼

电 话：400-900-1882

邮 箱：info@hillgene.com

网 址：www.hillgene.com



关注公众账号
获取更多咨询