

CD19 CAR-NK 现货病毒

使用说明书

Cat.No. HG-CN1901

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

CD19（也称为分化簇 19、B 淋巴细胞表面抗原 B4 或 CVID3）是一种糖蛋白在 B 细胞成熟的大部分阶段在 B 淋巴细胞表面表达。它是 B 细胞严格要求的细胞终末分化。CD19 基因的突变导致严重的免疫缺陷综合征与受损的抗体产生，如 CVID3（普通可免疫缺陷 3）。大多数 B 细胞恶性肿瘤表达正常到高水平的 CD19，使其成为癌症免疫治疗的近乎理想的靶点。

谱新生物基于第二代的 CAR-NK 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 CD19 CAR-NK 病毒，该病毒使用 **BaEV 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，连接有抗 CD19（克隆 FMC63）的 ScFv 部分，含有 CD8 铰链、4-1BB 同刺激结构域和 CD3Z 信号结构域，能够使 CAR-NK 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 CD19 CAR-NK 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作为**阳性对照**，**指导细胞工艺开发**，加速开发流程。

A

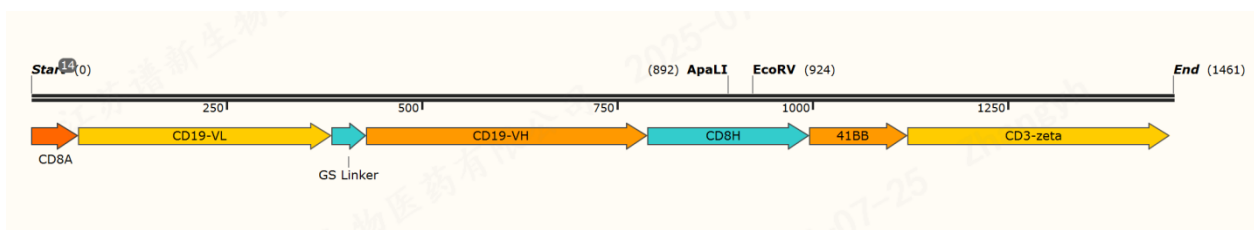
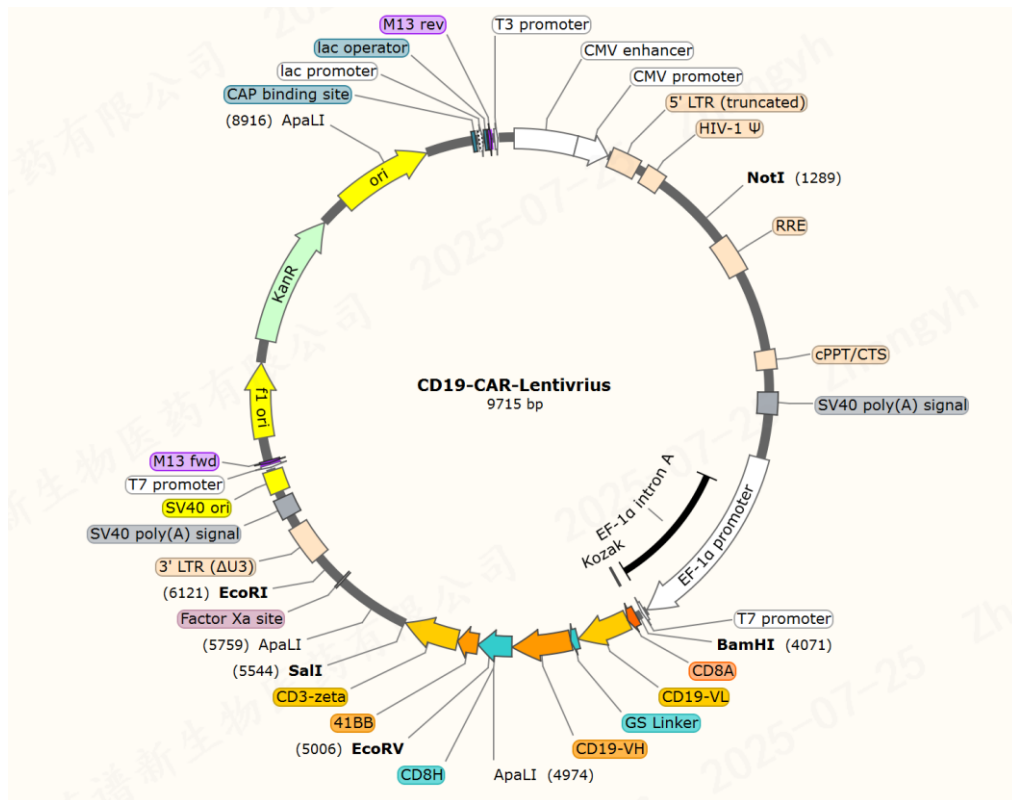


图 1 (A) 用于产生抗 CD19 CAR 慢病毒的 lenti-vector 的示意图。该载体含有卡那霉素的抗性基因。(B) 显示抗 CD19 CAR 组分的结构图。

2. 应用

NK 细胞中抗 CD19 CAR 评价的阳性对照。

病毒转导优化实验。

生成抗 CD19 CAR-NK 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
CD19 CAR-NK 现货慢病毒	HG-CN1901	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：CD19 CAR-NK 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

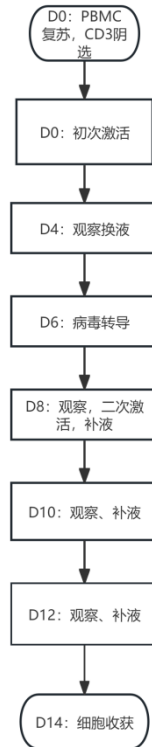
实验前请准备好下列试剂、耗材与设备：

- ◆ 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
- ◆ NK 细胞培养基

- ◆ CD3 细胞分选磁珠/分选柱
- ◆ K562 feeder cell
- ◆ 人白介素-2

7. 操作步骤

7.1. 流程图



7.2. 操作步骤 (Feeder 工艺)

7.2.1. NK 细胞完全培养液配制: NK 细胞培养基+血清替代物 SR (1%~10%) +IL-2 (200-600 IU /mL) 。

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。

CD3 细胞阴选: 将复苏后 PBMC 进行 CD3 磁珠阴选, 收集分选后的细胞。

K562 feeder cell 细胞复苏: 37°C水浴复苏 K562 feeder cell 细胞, 复苏后 K562 feeder cell 细胞于适量培养基中。400g、10 分钟离心洗涤一次, 弃上清, 用适量 NK 细胞完全培养基重悬均匀, 400g、10 分钟离心再次洗涤, 弃上清, 加入适量 NK 细胞完全培养基重悬均匀后取样计数。

初次激活: 根据 CD3 阴性分选细胞和 K562 feeder cell 计数结果, 按照一定的比例 (CD3 阴选细胞数量: K562 feeder cell 细胞数量 =1:1 或 1:2 或 1:4, 根据客户的工艺进行调整), 取相应体积的 CD3 阴性分选细胞和 K562 feeder cell, 将混匀后的 CD3 阴性分选细胞和 K562 feeder cell 转入合适培养容器, 并补加完全培养基调整细胞培养密度 1-5E5 /mL, 于 37°C、5%CO₂ 条件培养。

7.2.3. D4 观察换液:

观察细胞，并进行两倍体积的 NK 细胞完全培养基换液操作。

7.2.4.D6 病毒转导

取样进行 AOPI 计数，根据计数结果，剩余细胞 400g、8min 离心换液并进行转导，**转导 MOI=2-10，转导密度 5E5-2E6/mL。**

根据加入病毒载体后的细胞悬液总体积，按照转导增强剂：细胞悬液的体积比 1:100 加入 Viral E-hance C，缓慢吹打混匀；细胞、放置于 37°C 和 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24~48h；

取出转导后的细胞悬液，室温 400g、离心 8min，弃上清后，用完全培养基重悬细胞沉淀，调整细胞密度为 2-5E5 cells/mL，置于 37°C 和 5% CO₂ 培养箱中继续培养，每隔 2-3 天补液，调整细胞密度为 2-5E5 cells/mL。

7.2.5.D8 观察、二次激活和补液：

观察细胞，细胞取样计数，按照一定的比例（推荐 NK 细胞数/K562 feeder cell 细胞数量=1:1 或 1:2 或 1:4，根据客户的工艺进行调整）取相应体积的 K562 feeder cell，并补加 NK 细胞完全培养基调整细胞密度至 2-5E5 /mL。

7.2.6.D10 观察补液：

观察细胞，取样计数，根据培养基颜色变化或细胞浓度补加 NK 细胞完全培养基调整细胞密度 2-5E5 /mL。

7.2.7.D12 观察补液：

观察细胞，取样计数，根据培养基颜色变化或细胞浓度补加 NK 细胞完全培养基调整细胞密度 2-5E5 /mL。

7.2.8.D14 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-NK 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-NK 细胞扩增培养状态可能存在差异性，此时对 CAR-NK 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 NK 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，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。
	CAR-NK 细胞培养体系有待优化	由于培养体系未能提供足够的营养支持 CAR-NK 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
BaEV 基因拷贝数检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-BA001
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 C	HG-PTD001-C-R
基因改造的 K562 滋养层细胞	HG-FEC002-RU-1
	HG-FEC002-RU-4
HIV-1 p24 ELISA 检测试剂盒	HG-P001
K562 feeder cell 残留检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-KF001
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