

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
T150KJ	LymGro® OpT 淋巴细胞无血清培养基	500 mL	12 个月	液体	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰

1. 产品描述

LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基, 专门设计用于人淋巴细胞的体外培养和扩增。产品适用于人外周血来源的 T (包括 CAR-T)、DC、CIK、NK 等淋巴细胞的研究及应用。通过添加不同的细胞刺激因子, 可高效快速扩增相应的淋巴细胞。也可用于培养功能上存在分化的淋巴细胞系, 研究信号转导途径, 以及执行有成分定义要求的应用等。与市面上常用的淋巴细胞无血清培养基 (包括源培的常规款淋巴细胞无血清培养基) 相比, 该产品主要的特点是支持高密度培养, 密度可达 3×10^6 Cells/mL。LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基在无血清条件下, 已经可以得到较好的效果, 如有条件, 可适当补充人 AB 血清, 可能会得到更加优越的性能表现。

本产品使用注射用水 (Water-For-Injection) 配置。

本产品关注点

含有 (+)

- D-葡萄糖
- L-谷氨酰胺
- L-丙氨酰谷氨酰胺
- 酚红

2. 企业质量体系

上海源培生物科技股份有限公司的产品是在 cGMP 标准车间中生产的。

上海源培生物科技股份有限公司已取得 ISO 9001:2015、ISO13485:2016 质量体系认证。

3. 产品参数

本产品为过滤除菌产品

物理外观: 红色澄清液体

内毒素: ≤ 1 EU/mL

渗透压: 280 ~ 330 mOsm/kg·H₂O

pH 值: 7.0 ~ 7.4

储藏条件: 2 ~ 8 °C, 避光

运输条件: 蓝冰

4. 使用指南

准备培养基

LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基内含 L-谷氨酰胺 (L-Glutamine) 和 L-丙氨酰谷氨酰胺。针对不同的使用或者样本需求,

培养基在使用前应加入合适的细胞因子 (加入细胞因子后应立刻使用)。

实验过程中使用的生理盐水均可用不含钙镁离子的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS) 代替。

细胞培养的条件

培养基: LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基

细胞种类: 人外周来源的血淋巴细胞, 如 T (包括 CAR-T)、

DC、CIK、NK 等。

培养方式: 悬浮培养

培养容器和设备: 培养瓶、培养袋、WAVE 生物反应器和 CO₂ 恒温培养箱

培养条件: 36 ~ 38 °C, CO₂ 含量 4 ~ 6 % 的湿润空气, 避光。

PBMC 细胞的分离

1. 将采集的外周血收集到 2 支无菌离心管中, 2000 rpm/min 离心 5 min, 弃上清, 加生理盐水至 25 mL, 使沉淀细胞充分悬浮。另取 1 支离心管, 加入淋巴细胞分离液 20 mL, 用滴管将血细胞悬液缓慢转移至淋巴细胞分离液的表面, 使二者之间形成清晰的界面;

2. 2000 rpm/min 离心 20 min 后, 从管底到液面分为 4 层, 依次为红细胞和粒细胞层、淋巴细胞分离液层、外周血单个核细胞层 (PBMC 层)、血浆层。用吸管将 PBMC 层吸出, 转移至另一支无菌离心管中;

3. 加 DPBS 至 40 mL, 1500 rpm/min 离心 5 min, 结束后弃上清, 重复此步骤 3 次;

4. 最后一次离心结束后, 弃上清, 加入 40 mL 的 LymGro™ OPT 淋巴细胞无血清培养基在推荐的培养条件下培养。

细胞培养步骤

以下过程作为免疫细胞静态培养的一般方法。

在对数生长期时, 进行细胞饲养和维持, 使细胞达到所需数量。每当活细胞密度达 2×10^6 个/ml 时, 使用新鲜的培养基, 将培养物体积稀释一倍, 继续培养。

为了获得良好的气体交换, 建议培养基深度不超过 1.2 cm (最佳深度 1 ~ 1.2 cm)。

如需在生物反应器或培养袋中高密度培养, 应优化条件来确定最佳的操作步骤。

T 细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 进行细胞计数;
2. 培养初期, 用预热的含细胞因子 (如 IL-2) 的 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基重悬 PBMC, 活细胞密度保持在大约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml, 转移细胞到相应的细胞培养容器中, 然后放入培养箱内培养。

注意: 随后可应用各种操作激活 T 细胞, 包括添加刺激的抗体或抗原呈递细胞。无论培养 T 细胞的规模大小, 细胞均可被隔离、激活和扩大。

单核细胞树突状细胞 (DC) 培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞;
 2. 保证细胞分离后, 已经放入培养箱中培养过 2 ~ 3 小时;
 3. 弃掉含非贴壁细胞的培养基;
 4. 用生理盐水洗涤贴壁细胞 (主要是 CD14+ 单核细胞) 三次;
 5. 添加重组人 IL-4 和重组人 GM-CSF 到 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基, 至终浓度分别为 50 ~ 100 ng/ml 和 50 ng/ml, 并以此培养基培养贴壁细胞。保持细胞度在 $1 \sim 3 \times 10^5$ 个/cm² 之间;
 6. 在培养箱中连续培养 5 天。建议第 3 天左右, 使用预热的已添加 IL-4 和 GM-CSF 的 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基换液, 换液过程务必保留所有细胞。即将培养器皿中的液体转移至 15 ml 无菌的离心管中 (器皿中依旧有贴壁细胞), 以 $200 \times g$, 5 ~ 10 分钟的条件离心, 吸除上清, 然后加入与上清等体积的预热的培养基重悬细胞, 并再次转移入之前包含贴壁细胞的培养器皿中, 继续培养;
 7. 6 天之后, 细胞表现出典型的树突状细胞的形态和表面标记 (比如 CD1a、CD80、CD86、HLA-DR) ;
 8. 向 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基中添加 1 ng/ml 的 LPS 或者 50 ng/ml 的 TNF- α 诱导树突状细胞的成熟;
 9. 当细胞达到所需数量时, 即可离心收集细胞待用。
- 注意: DC 培养过程中, 如有发黄, 则换液, 补加相关细胞因子。

细胞因子诱导的杀伤细胞 (CIK) 细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 最后一次离心去上清之后, 使用少量预热的含 IFN- γ (1000 U/ml) LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基重悬, 进行细胞计数;

2. 以 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml 活细胞密度接种入上述培养基中;
3. 放入培养箱中培养 24 小时;
4. 加入 IL-1 α (0.1 U/ml)、CD3 单抗 (50 ng/ml)、重组人 IL-2 (0.3 U/ml), 继续培养; 每 3 天加入新的预热的 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基, 然后补加 IL-2 (0.3 U/ml), 保持活细胞密度在 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml;
5. 分别于第 5、7、9 天取细胞做表型分析 (FCM 检测) 和细胞杀伤实验 (MTT 法) ;
6. 当细胞达到所需剂量时, 即可离心收集细胞待用。

注意: CIK 培养过程中, 如发现培养液发黄, 则换液, 换液后补加 IL-2。如发现有细胞团块结为不良絮状, 则用离心管收集后静置沉降 5 min 左右, 待絮状物沉淀后, 小心将上清细胞悬液倒回培养瓶中。

DC-CIK 细胞联合培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 在最后加入 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基之后, 将细胞转移至 3 个无菌培养容器中, 标记 A1、A2、A3;
2. 放入培养箱中培养过 2 ~ 3 小时;
3. 取出培养的细胞, 分别将 A1、A2 和 A3 中悬浮的淋巴细胞转移至另外 3 个无菌的培养容器中, 分别记为 B1、B2、B3。其中 A 瓶参考上述 DC 细胞的培养方法第 4 ~ 8 步操作; B 瓶参考上述 CIK 细胞的培养方法第 1 ~ 4 步;
4. 第 8 天铲下 A 瓶 DC 细胞, 收集后与相应的 CIK 混合共培养。A 瓶弃去。如果总的细胞量过于庞大, 也可将 DC 和 CIK 混合后均分到 A 和 B 瓶中;
5. 共培养的 DC-CIK 于第 10 天做微生物检测;
6. 当细胞达到所需剂量时, 即可离心收集细胞待用。

自然杀伤 (NK) 细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 最后一次离心去上清之后, 使用少量预热的 NK 细胞活化及增殖因子的 LymGro® OPT 淋巴细胞无血清培养基重悬, 进行细胞计数, 然后以 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml 活细胞密度接种入上述培养基中;
- 注意: 相关因子包括 anti-CD3、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21, 浓度根据具体情况调整。
2. 当细胞生长到第 3 天离心换液 (1500 rpm, 5 min) 更换新鲜培养基及相关细胞因子;
 3. 第 4 ~ 6 每天镜检观察计数, 根据细胞悬液颜色添加培养液, 每次添加应为总体积的三分之一左右。
 4. 第 7 天计数, 当细胞量大于 6×10^7 时, 则需加入扩增试剂, 如细胞数量在 $3 \sim 6 \times 10^7$ 时, 则长至第八天在添加 NK 扩增培养试剂, 加液时使总细胞浓度保持在 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/ml。

- 当培养液体积大于 150 ml 或细胞数量大于 1.5×10^8 时则需转移至培养袋培养;
- 第 8 ~ 11 天每天镜检观察计数, 根据细胞悬液颜色加培养液。第 12 ~ 14 天观察需加液时, 细胞浓度需保持在 2×10^6 cells/ml;
- 当细胞达到所需剂量时, 即可离心收集细胞待用。

嵌合抗原受体 T(CAR T)细胞培养

因为 CAR T 细胞是基因修饰的 T 细胞, 细胞培养是 CAR T 细胞整体实验的一部分。本处主要介绍如何培养能够稳定表达 CAR 的 T 细胞的一般实验步骤, 对于 CAR T 其它相关操作, 本说明仅做普通描述:

- 选取靶点: 已知肿瘤特异抗原 (或相关抗原) 或者鉴定新抗原;
- 获取 scFv: 免疫小鼠, 构建基因文库, 筛选高亲和力 scFv;
- 构建 CAR T 细胞: 构建 CAR 表达载体, 分离 T 细胞 (可参考前述实验方法), 转染并筛选稳定表达 CAR 的 T 细胞;

4. 稳定表达的 CAR T 培养:

- 进行细胞计数;
- 用预热的含细胞因子 (如 IL-2) 的 LymGro[®] OPT 淋巴细胞无血清培养基重悬 CAR T 细胞, 活细胞密度保持在大约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml, 以后 转移细胞到相应的细胞培养容器中, 然后放入培养箱内培;
- 每 3 天加入新的预热的 LymGro[®] OPT 淋巴细胞无血清培养基, 然后补加 IL-2 (0.3 U/ml), 保持活细胞密度在 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml;
- CAR T 细胞体外验证: 细胞培养到所需数量时, 做细胞因子表达鉴定以及裂解靶向肿瘤细胞实验;
- 验证符合需求后, 收集细胞备用。

细胞悬液的制备

离心 (1500 rpm, 5 min) 收集细胞去上清, 使用含 0.5 ~ 1% 白蛋白的生理盐水洗涤细胞, 重复 3 次; 最后用少量重悬液重悬细胞, 进行细胞计数, 再根据需要的细胞密度补充液体到合适体积, 配成细胞悬液。

5. 相关产品

货号	品名	规格	存储条件	运输条件
T110KJ	LymGro [®] OPT 淋巴细胞无血清培养基, 含 HSA	500 mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
T120KJ	LymGro [®] OPT 淋巴细胞无血清培养基, 含 HSA, 不含酚红	500 mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
R710JV	样本密度分离液, 1.077	100 mL	2 ~ 30 °C	常温
S110JV	青霉素-链霉素 双抗溶液 100X	100 mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S210JV	L-谷氨酰胺溶液, 100X *	100 mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S240JV	L-丙氨酰-谷氨酰胺溶液, 100X *	100 mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
B210KJ	Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS), 不含钙、镁离子和酚红	100 mL	2 ~ 30 °C	常温
B310KJ	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.2	500 mL	2 ~ 30 °C	常温
B320KJ	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.4	500 mL	2 ~ 30 °C	常温

* 100X 代表产品的浓度是工作浓度的 100 倍。