

CAR-T 细胞培养试剂盒说明书

【产品名称】CAR-T 细胞培养试剂盒

【产品货号】

【包装规格】

一盒 CAR-T 细胞培养试剂盒：1 支试剂 A（500 μ L/支）、1 支试剂 B（500 μ L/支）、1 支试剂 C（1mL/支）、4 支试剂 D（1000 μ g/支）、1 支试剂 E（500 μ L/支）、4 支病毒浓缩液（1.5mL/支）

【预期用途】

本 CAR-T 培养试剂盒用于从 10mL 人外周血中诱导并培养成 CAR-T 细胞，经 7 天培养，收获约 4×10^7 个细胞，CD3+CAR+细胞比例 $\geq 30\%$ ，细胞活性 $> 95\%$ 。

【储存条件及有效期】

保存及运输在 -80°C 。

有效期 6 个月。

【样本要求】

本试剂盒要求人新鲜外周血分离获得的单个核细胞，且血常规检测中淋巴细胞数量在正常范围内，血液收集时应无菌操作且处理和运输过程中避免冷冻

【使用方法】

1. 准备工作

从 -80°C 冰箱中取出 1 支试剂 A 和 1 支试剂 D，放于 4°C 解冻。取出一个 Tissue-Culture 处理的 6 孔板，在超净工作台中拆封，向孔中加入试剂 A（120 μ L/孔）、试剂 D（250 μ g/孔）、DPBS（1mL/孔），吹打混匀，确保液体完全覆盖孔底， 4°C 避光孵育 12h。

2. 淋巴细胞分离

2-1. 提前 30min 将淋巴细胞分离液从 4°C 冰箱中取出置于室温，待温度升至室温后使用。

2-2. 将抗凝血以 700g 离心 20min（降速最慢），收集上层血浆， 56°C 灭活 30min，然后 4°C 放置 15min，最后 2000g 离心 15min 后吸取上层血浆，标记为热灭活血浆， 4°C 保存备用。

2-3. 除去血浆后的下层血液加入 DPBS 至原血液体积，混匀，沿管壁缓慢加至与血液等量的淋巴细胞分离液上，注意保持清楚的界面，以 800g 离心 15min（缓升缓降），离心管中由上至下分为四层。第一层为 DPBS 层，第二层为环状乳白色淋巴细胞，第三层为分离液层，第四层为红细胞层。

2-4. 收集第二层环状乳白色淋巴细胞加入到一个 50ml 离心管中，补加 DPBS（或生理盐水）至 50ml，600g 离心 10min，弃上清液，再用 DPBS（或生理盐水）重悬细胞，此步骤取样进行细胞计数，500g 离心 10min，弃上清液。

3. 淋巴细胞接种

3-1. 每 1mL 551 空白培养基中加入 12.5 μ L 试剂 B、1 μ L 试剂 C 和 1 μ L 庆大霉素。

3-2. 取出 1. 中包被好的孔板，弃去孔中液体。

- 3-3. 使用配置好的完全培养基将 2-4. 中获得的淋巴细胞稀释成细胞密度 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液，并接种到 3-2. 中包被好的孔中，接种量为 3×10^6 个细胞/孔。放入恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中培养 24h。
4. 从 -80°C 冰箱中取出 1 支试剂 A 和 1 支试剂 D，放于 4°C 解冻。取出一个 Tissue-Culture 处理的 6 孔板，在超净工作台中拆封，向孔中加入试剂 A（ $120\mu\text{L}/\text{孔}$ ）、试剂 D（ $750\mu\text{g}/\text{孔}$ ）、DPBS（ $1\text{mL}/\text{孔}$ ），吹打混匀，确保液体完全覆盖孔底， 4°C 避光孵育 12h。
5. 将 3-3. 中的细胞吸出，加入到 4. 中包被好的孔中，放入恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中培养 24h。
6. 病毒侵染
- 6-1. 待 5. 中的细胞培养 24h 后，弃去 2mL 培养基，向其中加入 2mL 新鲜的 551 培养基（1mL 551 培养基中加入 $25\mu\text{L}$ 试剂 B、 $1\mu\text{L}$ 庆大霉素、 $1\mu\text{L}$ 试剂 C 和 $12\mu\text{L}$ 试剂 E）。
- 6-2. 从试剂盒中取出病毒浓缩液，冰上解冻，按每孔 1.5mL 病毒将其逐滴加入到孔中后， 300g 室温离心 10min，放入恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中。以此为计时 0 点。
7. CAR-T 细胞培养
- 7-1. 24h 时，取出孔板，在超净台中小心弃去 1.5mL 上清液，向其中加入 1.5 mL 新鲜的 551 完全培养基（每 1mL 培养基中加入 $12.5\mu\text{L}$ 试剂 B， $1\mu\text{L}$ 试剂 C、 $1\mu\text{L}$ 庆大霉素、 $100\mu\text{L}$ 自体血浆），吹打混匀，放回恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中。
- 7-2. 48h 时，取出孔板，在超净台中小心弃去 3mL 上清液，向其中加入 3mL 新鲜的 551 完全培养基（每 1mL 培养基中加入 $12.5\mu\text{L}$ 试剂 B， $1\mu\text{L}$ 试剂 C、 $1\mu\text{L}$ 庆大霉素、 $100\mu\text{L}$ 自体血浆），吹打混匀，放回恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中。
- 7-3. 72h 时，取出孔板，在超净台中小心弃去 3mL 上清液，向其中加入 3 mL 新鲜的 551 完全培养基（每 1mL 培养基中加入 $12.5\mu\text{L}$ 试剂 B， $1\mu\text{L}$ 试剂 C、 $1\mu\text{L}$ 庆大霉素、 $100\mu\text{L}$ 自体血浆），吹打混匀，放回恒温培养箱（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度）中。
8. CAR-T 细胞收获
- 96h 时将细胞从孔中完全吹打下来，以 $400\text{g} \times 5\text{min}$ 离心条件用生理盐水洗涤细胞 2 次，细胞计数，用生理盐水重悬细胞制成终制品，封装。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒标签、各组分标签清晰，易识别，各试剂小管置于产品内包装中，各组分齐全，液体无渗漏。
2. 细菌内毒素： $< 0.5\text{EU}/\text{ml}$ 。
3. 细菌：无细菌检出。
4. 真菌：无真菌检出。
5. 支原体：无支原体检出。
6. 细胞生长测试：经 7 天培养，细胞收获数 $\geq 4 \times 10^7$ 个， $\text{CD3}+\text{CAR}+$ 细胞比例 $\geq 30\%$ ，细胞活性 $> 95\%$ 。

【注意事项】

1. 各试剂应置于规定储存条件保存，避免微生物的污染。
2. 使用前，试剂盒试剂从-80℃条件下取出，置于4℃条件下缓慢解冻。
3. 使用前，试剂盒试剂需瞬时离心。
4. 不同批次试剂盒中各组分不可互换使用。
5. 使用前仔细阅读说明书，在产品有效期内使用，严禁使用过期产品。

【标识的解释】 无**【基础信息】**

备案人/生产企业名称：深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司

住所：深圳市龙华新区龙华街道清祥路清湖工业园宝能科技园6栋A座15楼ABCDEF单位

邮政编码：518109

联系方式：0755-86548612

网址：<http://www.morecell.com.cn/>

售后服务单位名称：深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司

联系方式：0755-86548612

生产地址：深圳市龙华新区龙华街道清祥路清湖工业园宝能科技园6栋A座15楼ABCDEF单位

生产备案凭证编号：

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】**【说明书批准日期及修改日期】** 默赛尔
BIOMEDICAL