

使用PRIME-XV FreezIS DMSO-Free冻存液的PBMCS以及T细胞冻存方案

以下是经过优化的方案，使用PRIME-XV FreezIS DMSO-Free (货号#91140)冻存PBMCS和T细胞冻存液。该程序使用6个健康捐赠者的血液样本的白细胞层作为起始材料，采用手动和自动两种方法进行。我们使用了6个健康供体的白细胞层作为起始材料，并进行了手动和自动冻存方案。

材料：试剂

- PRIME-XV T Cell CDM (FUJIFILM Biosciences; Cat. # 91154)
- IL-2 (CellGenix; Cat. # 1420-050)
- CD3 (Miltenyi Biotec; Cat. # 130-093-387)
- CD-28 (BioLegend; Cat. # 302934)
- PRIME-XV FreezIS DMSO-Free (FUJIFILM Biosciences; Cat. # 91140)
- PRIME-XV FreezIS Cryopreservation Medium (FUJIFILM Biosciences; Cat. # 91139)
- FBS (Gibco, Cat. # 10101-145)
- DPBS 1x (Lonza; Cat. # 17-512F)
- WFI (Galenica Senese, Cat. # AA0013004)
- Cryoserv DMSO (Mylan/Lagitre, Cat. # 67457-178-50)
- has Human Albumin (Kedron; Cat. # AIC 021111024)
- NaCl Solution 9mg/mL (Galenica Senese; Cat. # AA0492027)
- Human Serum Albumin Antibody (R&D System; Cat. # IC1455P)
- CD3 (BD Biosciences Cat. # 51-9007098)
- CD4 (BD Biosciences Cat. # 561843)
- CD8 (BD Biosciences Cat. # 561947)
- CD14 (BD Biosciences Cat. # 561712)
- CD19 (Miltenyi Biotec; Cat. #130-110-351)
- CD56 (BD Biosciences Cat. # 561903)
- PD1 (BD Biosciences Cat. # 561272)
- SHEATH Fluid (Sony; Cat. # AE700713)
- FACS beads (Sony; Cat. # LE-B3001)

实验方案：手动

使用Ficoll-Paque试剂分离和冻存来自于白细胞层的PBMCS。

- 1.在DPBS中对白细胞层进行4倍稀释。
- 2.将16毫升Ficoll-Paque试剂移入Leucosep管中。将锥形管以1000 x g离心30秒。
- 3.将稀释后的细胞悬液转移至准备好的Leucosep管中，添加PBS直至总液量达到每管50mL。
- 4.在室温（RT）下，锥形管在无制动的吊桶式离心机中以1000 x g离心10分钟。在Leucosep管的多孔屏障上方会分成三层：血浆层、含有PBMCS的间相和一小层Ficoll-Paque。将血浆层废弃。
- 5.将屏障上方含有PBMCS的间相转移到一个新的50mL锥形管中。
- 6.在锥形管中加入DPBS，并在RT下以300 x g离心10分钟。小心地去除上清液。
- 7.为了去除血小板，将细胞沉淀重悬于50mL的DPBS中，并在RT下以200 x g离心15分钟。小心地清除上清液。步骤7重复两次以确保血小板的去除。
- 8.将细胞沉淀重新悬浮在RPMI 1640中。使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪进行细胞计数。

9. 对新鲜分离的PBMCS (1x10⁵ cells/marker) 等分试样进行分析，通过荧光激活细胞分选（FACS）评估CD3+、CD14+、CD56+和CD19+的细胞群体的百分比。

10. 细胞以2.5x10⁶ cells/mL和5x10⁶ cells/mL的细胞密度在四种不同的冻存培养基中冻存。

- **冻存培养基溶液1：**
90% FBS + 10% DMSO
- **冻存培养基溶液2：**
PRIME-XV FreezIS冻存培养基
- **冻存培养基溶液3：**
90%人血清白蛋白（HSA）+10%DMSO
- **冻存培养基溶液4：**
PRIME-XV FreezIS DMSO-Free冻存培养基

11. 将细胞转移至Nalgene® Mr. Frosty的冻存容器中，并在-80°C下孵育48小时。

12. 48小时后，将冻存管移至气相液氮罐中。

复苏、活化及扩增PBMCS

1. 四个月，复苏上述每个条件下的PBMCS冻存管。使用双倍体积的PRIME-XV T Cell CDM (Cat. # 91154)扩增培养基重悬细胞，并以300 x g离心10分钟。根据使用的离心机型号，将加速和制动设置为最小值。离心后，将细胞重悬于1 mL的补充过300 IU/mL IL-2、50 ng/mL Anti-CD3（克隆号OKT-3）和125 ng/mL Anti-CD28（克隆号CD28.2）的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基中。

2. 使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定细胞数及细胞活率。

3. 通过FACS分析等分试样中的细胞（1x10⁵ cells/marker），以评估CD3+、CD14+、CD56+和CD19+的细胞群体的百分比。

4. 将细胞以1x10⁶ cells/well的细胞密度接种至G-Rex 24孔板。每孔含有8 mL补充过300 IU/mL IL-2、50 ng/mL Anti-CD3（克隆号OKT-3）和125 ng/mL Anti-CD28（克隆号CD28.2）的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基。

5. 72小时后，吸去6 mL的培养基。使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定细胞数及细胞活率。加入6 mL新鲜的补充过300 IU/mL IL-2的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基。

6. 在第7天和第10天重复步骤5。

7. 在第13天终止培养。吸去6 mL的培养基，将细胞重悬于剩余的2 mL培养基中。使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定细胞数及细胞活率。通过FACS分析等分试样中的细胞（1x10⁵ cells/marker）以评估CD3+、CD14+、CD56+和CD19+的细胞群体的百分比。

8. 剩余的细胞以2.5 x 10⁶ cells/mL的细胞密度冻存于四种不同的冻存培养基中（见第一节，步骤10）。

使用PRIME-XV FreezIS DMSO-free冻存液的PBMCs以及T细胞冻存方案

(续)

9. 将细胞转移至Nalgene® Mr. Frosty的冻存容器中，并在-80℃下孵育48小时。
10. 48小时后，将冻存管移至气相液氮罐中。
11. 1个月后，复苏上述每个条件下的冻存管，进行细胞计数和细胞活率评估，以及表面标志物表达的FACS分析。

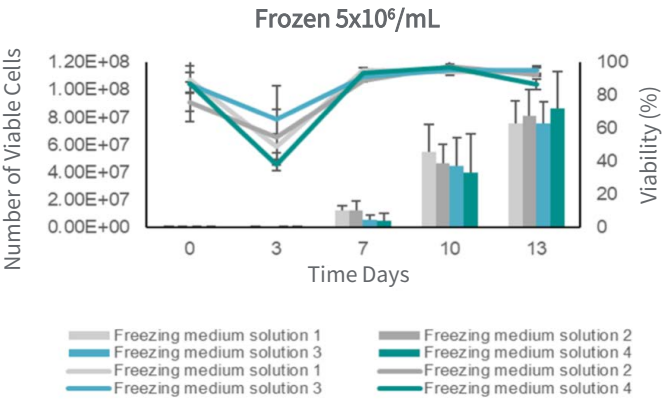
实验方案：自动

1. 在DPBS中对白细胞层进行4倍稀释。
2. 根据Platelet Free的操作规程以及使用CT 60.1 kit按照仪器供应商推荐设置，对稀释后的白细胞层进行清洗以去除血小板。
3. 经过PlateletFree流程，输出袋中会获得220 mL清洗后的白细胞层。将袋子作为输入端接入分离流程（NeatCell流程），并使用Ficoll Paque试剂。PBMCs分离过程按照仪器供应商推荐的设置使用CT 90.1 kit。
4. 在最终的袋子中自动获得含有50 mL重悬于RPMI 1640的PBMCs。使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定细胞数及细胞活率。
5. 将每个供体对应的含有 24×10^6 个细胞的悬液转移到15 mL的离心管中，以 $300 \times g$ 离心5分钟。将细胞沉淀重悬于补充过300 IU/mL IL-2、50 ng/mL Anti-CD3（克隆号OKT-3）和125 ng/mL Anti-CD28（克隆号CD28.2）的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基中。剩余的细胞冻存于不同的含DMSO的培养基中，未应用于此次实验。
6. 将细胞接种至G-Rex 24孔板。每个供体准备一个G-Rex板，每孔含有8 mL补充过300 IU/mL IL-2、50 ng/mL Anti-CD3（克隆号OKT-3）和125 ng/mL Anti-CD28（克隆号CD28.2）的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基。接种密度为 1×10^6 cells/well。
7. 72小时后，吸去6 mL的培养基进行细胞计数。使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定细胞数及细胞活率。加入6 mL新鲜的补充过300 IU/mL IL-2的PRIME-XV T Cell CDM扩增培养基。

8. 第7天，用FACS分析细胞，评估CD3+、CD4+和CD8+的细胞群体百分比。
9. 将扩增后的T细胞以 5×10^6 cells/mL的密度冻存于四种不同的冻存培养基中。

- **冻存培养基溶液1：**
90% FBS + 10% DMSO
- **冻存培养基溶液2：**
PRIME-XV FreezIS冻存培养基
- **冻存培养基溶液3：**
90%人血清白蛋白（HSA）+10%DMSO
- **冻存培养基溶液4：**
PRIME-XV FreezIS DMSO-Free冻存培养基

10. 将细胞转移至Nalgene® Mr. Frosty的冻存容器中，并在-80℃下孵育48小时。
11. 48小时后，将冻存管移至气相液氮罐中。
12. 4个月后，复苏上述每个条件下的T细胞冻存管，通过FACS分析测定CD3、CD4和CD8阳性的细胞百分比。同时，使用台盼蓝和Countess II自动细胞计数仪测定复苏后的细胞数及细胞活率。



Protocol developed and owned by Anemocyte Srl. Data provided courtesy of Anemocyte Srl.



FUJIFILM
Value from Innovation

富士胶片(中国)投资有限公司

公司地址：上海市浦东新区平家桥路100弄6号7号楼601单元
网址：<https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us>
销售咨询：021-5010 6000 转生命科学事业部