

## PRIME-XV T Cell CDM

PRIME-XV T Cell CDM 是一种即用型化学成分明确、不含动物成分的培养基。它专为培养人源 T 细胞而优化设计，建议用于人源 T 淋巴细胞的慢病毒转导、培养和扩增。我们在 G-Rex 培养容器和量子生物反应器中对来自人类外周血单核细胞 (PBMC) 的 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞进行了性能评估。PRIME-XV T Cell CDM 可与细胞因子补充剂一起用于体外培养人类 T 淋巴细胞。细胞因子的使用取决于每个用户的实验要求。

| 货号 #  | 产品                  | 规格                       |
|-------|---------------------|--------------------------|
| 91154 | PRIME-XV T Cell CDM | 1 L 液体<br>如需其他包装尺寸，请联系我们 |

## 预期用途

用于研究或进一步生产。不得用于注射或诊断程序。

## 质量保证

所有质量控制测试结果均在具体批次的分析证书上进行报告，该证书可在 <https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com> 或应要求提供。

## 储存说明和稳定性

使用无菌技术处理，以避免污染。储存于 2-8 °C，避光保存，待用。1 L PET 瓶装本品在原包装下于 2-8 °C 条件下可稳定保存 12 个月。开封后，应在 2-8 °C 下避光保存，并在 4 周内使用。请勿在指定有效期后使用。在未开封的保质期后使用无效。有关危害和安全处理方法的信息，请参阅安全数据表。

## 注意事项

本产品仅供研究或进一步生产使用。不得用于注射或诊断程序。本产品用于诊断或其他临床用途的安全性和有效性尚未确定。本试剂的使用期限不得超过说明中标注的储存方法 12 个月。本品在储存或培养过程中可能会产生一些蛋白质沉淀。这种蛋白质沉淀不会影响产品性能。有关危害和安全处理方法的信息，请参阅安全数据表。

## 使用说明

---

以下方案经过优化，可用于在 G-Rex 中使用 PRIME-XV T Cell CDM 扩增来自外周血单核细胞（PBMC）的活化 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞。

### 在 24 孔 G-rex 容器中扩增 T 细胞的方案

#### 第 0 天：T 细胞培养和活化

1. 使用前将足够体积的 PRIME-XV T Cell CDM 平衡至 37°C 至少 15 分钟。  
注：为避免温度循环，请在平衡前确定所需的总体积。
2. 将冷冻的细胞瓶在 37°C 水浴中轻轻搅拌解冻 1 分钟。或者使用新分离或收获的细胞。
3. 小心地将小瓶中的细胞全部转移到装有 10 mL PRIME-XV T Cell CDM 的 15 mL 锥形管中。
4. 将细胞以 300 g 离心 5 分钟。
5. 小心吸出上清液，留下覆盖细胞沉淀的最小体积培养基。
6. 在适当体积的 PRIME-XV T Cell CDM 中加入 200 IU/mL IL-2。
7. 在 7 mL 完全培养基中加入  $1 \times 10^6$  PBMCs/well ( $0.5 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>)。
8. 加入 1 µg/mL 人源 CD3/CD28 抗体。
9. 在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养细胞。

#### 第三天：继续刺激

10. 每孔再补充 200 IU/mL IL-2。

#### 第 5 天：更换培养基

11. 用移液管从孔的上边缘慢慢向下移取 5.25 mL 用过的培养基，小心避免意外吸入细胞。
12. 轻轻搅拌或重新悬浮剩余液体，使细胞均匀分散，以便进行细胞计数。
13. 加入 5.5 mL 补充有 200 IU/mL IL-2 的新鲜培养基。

#### 第 7 天：继续刺激

14. 每孔再补充 200 IU/mL IL-2。

#### 第 10 天：更换培养基

15. 用移液管从孔的上边缘慢慢向下移取 5.25 mL 用过的培养基，小心避免意外吸入细胞。
16. 轻轻捶打重悬剩余液体，使细胞均匀分散，以便进行细胞计数。
17. 加入 5.5 mL 补充有 200 IU/mL IL-2 的新鲜培养基。

#### 第 12 天：继续刺激

18. 每孔再补充 200 IU/mL IL-2。

#### 第 14 天：收获细胞

19. 用移液管从孔的上边缘慢慢向下移取 5.25 mL 用过的培养基，小心避免意外吸入细胞。
20. 轻轻捶打重悬剩余液体，使细胞均匀分散，以便进行细胞计数。
21. 收获剩余体积中的细胞。

## QUANTUM生物反应器中低种T细胞扩增方案

### 材料（每台机器）

- 1个量子中空纤维生物反应器细胞扩增组件（Terumo BCT Cat# 21000）
- 细胞扩增装置底液：至少2升PBS（FLBI Cat# 9240），装在量子兼容袋中
- 毛细血管内培养基（IC）：至少3.5升完全T细胞CDM（FLBI Cat# 91154）+ 200IU/mL IL-2（FLBI Cat# 95118），置于量子兼容袋中
- 毛细管外培养基（EC）：至少11升T细胞CDM，不含IL-2，置于量子兼容袋中
- 铝箔或其他保护袋避光的覆盖物
- $30 \times 10^6$  PBMCs
- 激活：市售T细胞激活磁珠
- 解冻细胞：T-175细胞培养瓶（康宁 Cat# 430641U）
- 最少1个细胞输入袋（Terumo BCT Cat# 21028）
- 最少4个废液袋（Terumo BCT Cat# 21030）

### 补充材料

- T-Seal Mobile 或其他兼容密封器（Terumo BCT Cat# T5460）
- TSCD-Q 无菌管道焊接器（Terumo BCT Cat# 92003）
- 5毫升鲁尔锁注射器
- 50毫升锥形管
- 酒精棉签
- 剪刀

### 第1天 细胞复苏

1. 如果是解冻细胞，则在37°C 5%CO<sub>2</sub>条件下，将细胞放入培养瓶和完全培养基中静置过夜。

### 第0天：准备细胞扩增装置并装载细胞

2. 按照《Quantum细胞扩增系统操作手册》（QCESOM）第7-2节的规定设置负载细胞扩增装置。
3. 原电池扩展装置（QCESOM 7-10）
4. 分离试管管路（QCESOM 7-11）
5. 将EC培养基袋连接至EC管路并运行IC/EC冲洗（QCESOM 第9-5节）  
使用以下设置进行冲洗：

|                        |                                         |
|------------------------|-----------------------------------------|
| IC inlet               | EC media                                |
| IC inlet rate (mL/min) | 100                                     |
| IC circ rate (mL/min)  | -17                                     |
| EC inlet               | EC media                                |
| EC inlet rate (mL/min) | 148                                     |
| EC circ rate (mL/min)  | -1.7                                    |
| Outlet                 | IC and EC outlet                        |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec)           |
| Stop condition         | Exchange (2.5 IC volume, 2.5 EC volume) |

6. 条件介质（QCESOM 第8-6节）

使用以下设置进行调节：

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| IC inlet               | None      |
| IC inlet rate (mL/min) | 0         |
| IC circ rate (mL/min)  | 20        |
| EC inlet               | None      |
| EC inlet rate (mL/min) | 0         |
| EC circ rate (mL/min)  | 30        |
| Outlet                 | EC outlet |

|                |                   |
|----------------|-------------------|
| Rocker         | Stationary (0° )  |
| Stop condition | Manual (≥ 10 min) |

- 在调节程序运行过程中，用 1:1 比例的市售 T 细胞激活磁珠活化 30x10<sup>6</sup> PBMCs 约十分钟，期间在室温下轻轻搅拌容器。进行细胞计数，并保存少量未经处理的样本用于流式细胞仪分析。
- 将 30x10<sup>6</sup> 个活化细胞、50 mL IC 培养基和至少 10 mL 空气装入细胞进样袋。
- 将相应的袋子连接到相应的管线上（IC 培养基、EC 培养基、细胞），并用一个新的袋子替换废袋。在整个培养过程中，根据需要更换废袋和 EC/IC 培养基袋，在更换过程中暂停程序。
- 从 EC 取样口取一份培养基样品，用于读取基线代谢物读数（QCESOM 第 5-7 节）。
- 设置并运行用于 T 细胞培养和培养基补液的自定义程序 1（QCESOM 第 13-2 节）。自定义程序 1 使用以下设置：

|                        | Step 1                        | Step 2                        | Step 3                        | Step 4            |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| IC inlet               | Cell                          | IC media                      | IC media                      | IC media          |
| IC inlet rate (mL/min) | 50                            | 50                            | 80                            | 0.1               |
| IC circ rate (mL/min)  | 0                             | 0                             | -40                           | -0.1              |
| EC inlet               | None                          | None                          | None                          | None              |
| EC inlet rate (mL/min) | 0                             | 0                             | 0                             | 0                 |
| EC circ rate (mL/min)  | 30                            | 30                            | 30                            | 30                |
| Outlet                 | IC outlet                     | IC outlet                     | EC outlet                     | EC outlet         |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | Stationary (0°)   |
| Stop condition         | Empty bag                     | IC volume (50 mL)             | IC volume (310 mL)            | Manual (2880 min) |

- 每天从导电率取样口收集导电率培养基样品，用于代谢物分析，并记录下这些样品的采集时间（QCESOM 第 5-7 节）。在培养过程中重复此操作。

## 第 2 天：开始补料

- 设置自定义程序 2，每天进行一次细胞混匀和培养基补液程序（QCESOM 第 13-2 节）。自定义程序 2 的设置如下：

|                        | Step 1 | Step 2   | Step 3   |
|------------------------|--------|----------|----------|
| IC inlet               | None   | EC media | IC media |
| IC inlet rate (mL/min) | 0      | 50       | 0.1      |
| IC circ rate (mL/min)  | 300    | -30      | -0.1     |
| EC inlet               | None   | None     | None     |

|                        |                               |                               |                   |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| EC inlet rate (mL/min) | 0                             | 0                             | 0                 |
| EC circ rate (mL/min)  | 100                           | 30                            | 100               |
| Outlet                 | EC outlet                     | EC outlet                     | EC outlet         |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | Stationary (0°)   |
| Stop condition         | Time (4 min)                  | IC volume (150 mL)            | Manual (1440 min) |

注意：在程序 2 的步骤 1 开始后 3.5 分钟暂停程序，以采集 EC 样品。取样完成后，可重新开始程序。

14. 第 3、4 和 5 天重新启动自定义程序 2，按步骤 13 所述采集导电率样本。

#### 第 5 天

15. 收集 IC 样本（QCESOM 第 5-5 节）和 EC 样本（QCESOM 第 5-7 节），并对细胞进行流式细胞术和计数。

16. 根据需要调整 IC 入口和循环速率，以维持培养液中适当的葡萄糖和乳酸水平。

#### 第六天

17. 设置自定义程序 3，每天进行两次细胞混匀和培养基补液程序（QCESOM 第 13-2 节）。

自定义 3 设置如下：

|                        | Step 1                        | Step 2                        | Step 3          |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| IC inlet               | None                          | EC media                      | IC media        |
| IC inlet rate (mL/min) | 0                             | 50                            | 0.4             |
| IC circ rate (mL/min)  | 300                           | -30                           | -0.2            |
| EC inlet               | None                          | None                          | EC media        |
| EC inlet rate (mL/min) | 0                             | 0                             | 0.8             |
| EC circ rate (mL/min)  | 300                           | 30                            | 300             |
| Outlet                 | EC outlet                     | EC outlet                     | EC outlet       |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | Stationary (0°) |
| Stop condition         | Time (4 min)                  | IC volume (150 mL)            | Time (720 min)  |

|                        | Step 4 | Step 5   | Step 6   |
|------------------------|--------|----------|----------|
| IC inlet               | None   | EC media | IC media |
| IC inlet rate (mL/min) | 0      | 50       | 0.4      |
| IC circ rate (mL/min)  | -300   | -30      | -0.2     |
| EC inlet               | None   | None     | EC media |

|                        |                               |                               |                  |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|
| EC inlet rate (mL/min) | 0                             | 0                             | 0.8              |
| EC circ rate (mL/min)  | 100                           | 30                            | 300              |
| Outlet                 | EC outlet                     | EC outlet                     | EC outlet        |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | Stationary (0°)  |
| Stop condition         | Time (4 min)                  | IC volume (150 mL)            | Manual (720 min) |

注意：在重新分配步骤 1 开始的 3.5 分钟内暂停程序，以采集 EC（QCESOM 第 5-7 节）和 IC（QCESOM 第 5-5 节）样品。取样完成后，可重新开始程序。

18. 在第 7 天和第 8 天重复 "自定义 3"，按步骤 17 所述采集 EC 和 IC 样品。对 EC 样品进行废培养基分析，对 IC 样品进行细胞计数和流式细胞术分析。
19. 根据培养基消耗率和废液袋填充率，调整 EC 速率，以维持培养基中适当的葡萄糖和乳酸水平。

## 第 9 天

20. 为细胞收获设置自定义程序 4（QCESOM 第 13-2 节）。  
自定义 4 设置如下

|                        | Step 1                        | Step 2                        |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| IC inlet               | None                          | EC media                      |
| IC inlet rate (mL/min) | 0                             | 100                           |
| IC circ rate (mL/min)  | 300                           | -20                           |
| EC inlet               | None                          | EC media                      |
| EC inlet rate (mL/min) | 0                             | 60                            |
| EC circ rate (mL/min)  | 300                           | 30                            |
| Outlet                 | EC outlet                     | Harvest                       |
| Rocker                 | In motion (-90°, 180°, 1 sec) | In motion (-90°, 180°, 1 sec) |
| Stop condition         | Time (4 min)                  | IC Volume (400 mL)            |

21. 对最终收获的细胞进行细胞计数、废培养基分析和流式细胞术。

## 使用说明

以下方案详细介绍了慢病毒转导和使用 G-Rex 培养系统在 PRIME-XV T Cell CDM 中扩增外周血单核细胞（PBMC）的过程。

### 引言

专门的病毒载体通常用于对免疫细胞进行基因改造，以应用于细胞疗法。来自不同供体的原代人类免疫细胞之间存在巨大差异，这对实现普遍有效的转导构成了障碍。同样，插入相对较大的基因片段和使用的转导方法也对转导效率产生了负面影响。PRIME-XV T Cell CDM 是一种化学成分明确的、不含动物成分的培养基，可支持人类 PBMCs 的转导和扩增，无需离心转导或转导增强剂。PRIME-XV T Cell CDM 在 cGMP 条件下生产，批次与批次之间保持一致，为慢病毒转导和随后 T 细胞的稳健扩增提供了有利环境。

### 批量激活

1. 如果是解冻而不是使用刚收获的细胞，则将细胞在 PRIME-XV T 细胞 CDM + 200 IU/mL IL-2 中静置过夜，使细胞从低温保存中恢复过来。
  - a. 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 加湿培养箱
2. 激活前计数细胞
  - a. 实验中每平方厘米 G-Rex 培养表面积至少需要  $0.125 \times 10^6$  cells（细胞计数指南见表 1）。
  - b. 注意：为了生成以下数据，FISI 使用了新鲜的 PBMCs（StemExpress #PBMNC300F）。
3. 在组织培养瓶中用  $\alpha$ CD3 和  $\alpha$ CD28 抗体激活细胞
  - a. 结合抗体
    - i. 用 PBS 配制 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3 和 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD28 抗体的溶液。
    - ii. 在 37° C 下涂布培养瓶表面 2 小时，或在 2-8° C 下过夜
    - iii. 如果过夜激活，用保鲜膜包住摇瓶盖以防止蒸发
    - iv. 在细胞培养前吸干缓冲液
    - v. 以  $1 \times 10^6$  cells/mL 到  $5 \times 10^6$  cells/mL 的密度培养细胞，以进行活化
    - vi. 活化时间最短 6 小时，最长 24 小时。
  - b. 可溶性抗体
    - i. 在细胞培养瓶中以  $1 \times 10^6$  cells/mL 至  $5 \times 10^6$  cells/mL 的密度培养细胞，以进行活化。
    - ii. 在细胞悬浮液中加入 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3 和 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD28 抗体
    - iii. 活化时间最少 6 小时，最多 24 小时
4. 细胞活化后，将细胞收集到无菌锥形管中，以 300g 离心 5 分钟。
5. 在 PRIME-XV T Cell CDM + 200 IU/mL IL-2 中重悬锥形管中  $0.5 \times 10^6$  cells/mL 的所需细胞量。
  - a. 预留一个等分试样作为阴性（无病毒）对照

### 慢病毒转导

**注：**个别应用可能需要对慢病毒进行滴定。PBMC 供体和特定慢病毒构建体之间的转导效率差异很大。所提供的浓度已针对使用 PGK 启动子的 GFP 报告慢病毒（Cellomics Technology #PLV-10077）转导 PBMC 进行了优化。

6. 向步骤 5 中制备的细胞悬浮液中添加慢病毒，感染倍率（MOI）应符合您的应用要求
  - a. FISI 使用 MOI = 5
7. 将步骤 6 中制备的 0.25 mL/cm<sup>2</sup> 慢病毒和细胞悬浮液混合物等分到每个容器中（转导体积见表 1）。
  - a. 建议使用步骤 3 中预留的阴性对照。
  - b. 每个条件准备一式两份或三份的对照孔。
8. 在正常组织培养条件下培养过夜
  - a. 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 加湿培养箱

9. 第二天，用 PRIME-XV T Cell CDM + 200 IU/mL IL-2 填充 G-Rex 孔或容器至最大容量（最大填充量见表 1）。
10. 在正常组织培养条件下，不受干扰地将细胞再培养两天。
  - a. 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 加湿培养箱
11. 根据需要培养和扩增细胞，最多 14 天。建议的耗用培养基分析时间点(SMA)、细胞计数和活力跟踪以及流式细胞仪分析的时间点为第 0、3、7、10 和 14 天。

| G-Rex Vessel                     | Min. cells per well or vessel (Steps 2 and 7) | Transduction volume (Step 7) | Maximum fill volume (Step 9) |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 24 Well Plate                    | 0.25 x 10 <sup>6</sup> cells/well             | 0.5 mL                       | 8 mL                         |
| 6 Well Plate                     | 1.25 x 10 <sup>6</sup> cells/well             | 2.5 mL                       | 40 mL                        |
| 6M Well Plate                    | 1.25 x 10 <sup>6</sup> cells/well             | 2.5 mL                       | 100 mL                       |
| 5M Open System & Closed System   | 0.625 x 10 <sup>6</sup> cells/unit            | 1.25 mL                      | 50 mL                        |
| 10M Open System & Closed System  | 1.25 x 10 <sup>6</sup> cells/unit             | 2.5 mL                       | 100 mL                       |
| 100M Open System & Closed System | 12.5 x 10 <sup>6</sup> cells/unit             | 25 mL                        | 1000 mL                      |
| 500M Open System & Closed System | 62.5 x 10 <sup>6</sup> cells/unit             | 125 mL                       | 5000 mL                      |

表 1. 在 G-Rex 细胞培养容器中转导细胞的最小细胞数、转导量和培养体积。

## 相关产品

| 货号 #   | 产品                               | 规格                  |
|--------|----------------------------------|---------------------|
| 91140  | PRIME-XV FreezIS 无DMSO细胞冻存液      | 10 mL, 100 mL       |
| 91139  | PRIME-XV FreezIS 细胞冻存液           | 10 mL, 100 mL       |
| 9240   | PBS 1X-杜氏磷酸盐缓冲盐溶液-液体             | 100 mL, 500 mL, 1L  |
| 500-01 | CTGrade rh IL-2 <sub>C126S</sub> | 50 µg, 100 µg, 1 mg |
| 500-07 | CTGrade rh IL-7                  | 50 µg, 100 µg, 1 mg |
| 500-16 | CTGrade rh IL-10                 | 50 µg, 100 µg, 1 mg |
| 500-08 | CTGrade rh IL-15                 | 50 µg, 100 µg, 1 mg |
| 500-09 | CTGrade rh IL-21                 | 50 µg, 100 µg, 1 mg |
| 91165  | BalanCD HEK293 培养基               | 1 L                 |
| 91166  | BalanCD HEK293 补料                | 500 mL              |

## 技术支持

---

### 联系我们

如需更多信息或帮助，请联系：

- 邮箱: [biopharma@fujifilm.com](mailto:biopharma@fujifilm.com)
- 电话：021-5010 6000 转生命科学事业部

### 网站资源

请访问网站<https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/>，获取技术资源和信息，包括：

- 安全数据表 (SDS)
- 原产地证书（如有）
- 常见问题
- 产品资料
- 各国办事处和联系信息完整列表

### 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