

AdoptCell® -NK Kit (For research use only)

< MATERIALS PROVIDED >

COMPONENTS	VIALS	STORAGE CONDITIONS
AdoptCell® -NK-F	2	R.T.
AdoptCell® -NK-M	120 mL	4 °C
AdoptCell® -NK-S	1 vial	4 °C
AdoptCell® -NK-B	12 mL	R.T.

< MATERIALS & SUPPLIES REQUIRED >

Required:

- Human peripheral blood or Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
- Normal human AB-serum (KOHJIN BIO; 12181301)
- Ficoll-Paque™
- Phosphate buffered saline (PBS) (-)
- CD3⁺ cell-depletion kit (Dynabeads™ CD3 , Invitrogen; 11151D)
※ Please contact us if you use other products.
- Centrifuge tubes (15 mL, 50 mL conical tubes)
- Centrifuge
- CO₂ incubator
- Medical refrigerator (4 °C)
- Microscope
- Pipettes and pipette tips

Optional:

- OptiPrep™

< REAGENT PREPARATION >

1. Add 1 vial of AdoptCell®-NK-S to 120 mL of AdoptCell®-NK-M. (Store at 4°C)
2. Preparation before use : Add 5% normal human AB serum to the medium prepared in step 1 (henceforth referred to as final medium).

< METHODS >

▷ Day0

- ※ If you have PBMCs, start from step 2.
1. Isolate PBMCs from peripheral blood using Ficoll-Paque™ or OptiPrep™.
※ Please refer to OptiPrep™ Application Sheet C05.
 2. Deplete CD3⁺ cells from PBMCs. (According to the protocol of Dynabeads™ CD3, catalog no. 11151D)
 3. Adjust the density of CD3⁺ depleted PBMCs to 5×10^5 cells/mL using 12.0 to 15.6 mL of the final medium per an AdoptCell® -NK-F
 4. Incubate at 37 °C and 5% CO₂ humidified incubator.

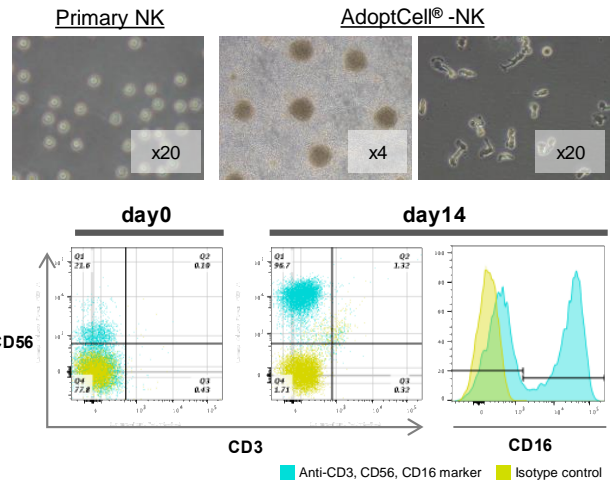
▷ Day9

5. Add the final medium to each flask to a final volume of 50 mL. (If you start with 12 mL, add 38 mL of the final medium.)

▷ Day14

6. Harvest the cultured cells into the centrifuge tube by gently pipetting for several times.
7. Optional: When the cells are adhered, add 5 mL of AdoptCell®-NK-B per an AdoptCell® -NK-F and wait for 3 to 5 minutes at room temperature.
8. Optional: Tap the side of flask and pipette gently, and collect the cell suspension into the tube from step 6.
Note : Do not treat with AdoptCell®-NK-B for 5 minutes or more, and do not pipette vigorously.
9. Wash the AdoptCell® -NK-F with PBS and collect suspension into the tube from step 6.
10. Centrifuge at 500 g for 5 minutes at room temperature. Remove AdoptCell®-NK-B by replacing with a solution, such as PBS and use for any assays.

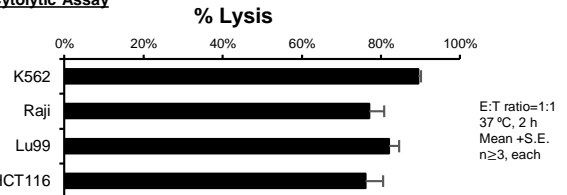
< Representative data >



Flow cytometric assay

PerCP/Cy5.5 anti-human CD3 antibody (BioLegend, 300430)
 PE/Cy7 anti-human CD16 antibody (BioLegend, 302016)
 Alexa Fluor®700 anti-human CD56 antibody (BioLegend, 318316)
 PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ isotype Ctrl antibody (BioLegend, 400150)
 PE/Cy7 Mouse IgG1, κ isotype Ctrl antibody (BioLegend, 400126)
 Alexa Fluor®700 Mouse IgG1, κ isotype Ctrl antibody (BioLegend, 400144)
 Analyzed using LSRFortessa (BD) with FlowJo Ver.10.4 software

Cytolytic Assay



Target cells: PKH26 (SIGMA, PHK26GL-1KT)

Death cells: 7-AAD

Analyzed using LSRFortessa (BD) with FlowJo Ver.10.4 software

%Lysis= [(% of target cell lysis - % of spontaneous cell death) / (% of maximum lysis - % of spontaneous cell death)] × 100
 spontaneous cell death : incubation of target cells in the cell alone
 maximum lysis : treatment of target cells with 10% formalin

< FREQUENTLY ASKED QUESTIONS >

- Q1. Why do cultured cells contain a large number of T cells?
 A1. Take care that the CD3⁺ cell proportion is less than 1% at the start of culture.
 If you use apheresis blood, we also recommend to remove CD34⁺ cells.
- Q2. Why do viability and activity appear to be low *in vivo*?
 A2. Although the stability of AdoptCell® NK has been confirmed in human blood, it has not been confirmed in mice, including NOG mice. Therefore, please try intraperitoneal administration.

< REFERENCES >

1. Saito S, Harada Y, Morodomi Y, Onimaru M, Yoshida K, Kyuragi R, Matsubara H, Yonemitsu Y. *Hum Gene Ther Methods*. 24(4):241-52, 2013.
2. Harada Y, Teraishi K, Ishii M, Ban H, Yonemitsu Y. In Chapter 5: Clinical Applications of Natural Killer Cells Ed. by Mourad Aribi: *Natural Killer cells*. InTech pp67-105, 2017.
 Available at:
<https://www.intechopen.com/books/natural-killer-cells/clinical-applications-of-natural-killer-cells>

AdoptCell® -NK Kit (研究用)

<梱包物>

	入り数	保管温度
AdoptCell® -NK-F	2	室温
AdoptCell® -NK-M	120 mL	4°C
AdoptCell® -NK-S	1 瓶	4°C
AdoptCell® -NK-B	12 mL	室温

<ご用意いただくもの>

必須:

- ・ヒト末梢血 または ヒト末梢血単核球
- ・正常ヒト血清AB型 (推奨品: コージンバイオ, 12181301)
- ・Ficoll-Paque™ (ヒト末梢血をご使用の場合)
- ・りん酸緩衝生理食塩水
- ・CD3陽性細胞除去用試薬 (推奨品: Dynabeads™ CD3, Invitrogen, 11151D)
※ その他の製品をご使用の場合はお問い合わせください。
- ・遠沈管 (15ml, 50ml)
- ・遠心分離機
- ・温度・湿度・CO₂濃度制御付細胞培養装置
- ・薬用保冷庫 (4°C)
- ・顕微鏡
- ・自動液体用微量体積計
- ・プッシュボタン式液体用微量体積計

オプション:

- ・OptiPrep™ (ヒト末梢血から無血血小板PBMCを分離する場合)

<培地調製方法>

1. AdoptCell®-NK-M 120 mLにAdoptCell®-NK-S 1瓶を溶解する。
(作成した溶液は保冷庫で保存する)
2. 必要量を用時調製: 1. で作成した培地に対して5%の正常ヒトAB型血清を加える (以下、調製培地という)。

<培養方法>

▷ 培養初日 (0日目)

- ※ヒト末梢血単核球から開始する場合は2. から開始する。
- 1. Ficoll-Paque™あるいはOptiPrep™を用いてヒト末梢血単核球を回収する。
※ OptiPrepを使用する場合はOptiPrep™ Application Sheet C05を参照
- 2. ヒト末梢血単核球からCD3陽性細胞を除去する (Dynabeads™ CD3, Invitrogen, 11151D の手順書に従う)。
- 3. 2. で得られた細胞を 5×10^5 cells/mLとなるように調製培地に懸濁し、AdoptCell®-NK-F 1個あたり細胞懸濁液12.0~15.6 mLを播種する。
※原材料が凍結品の場合には 1×10^6 cells/mlとなるように調製する
- 4. 37°C、5% CO₂の条件下で培養する。

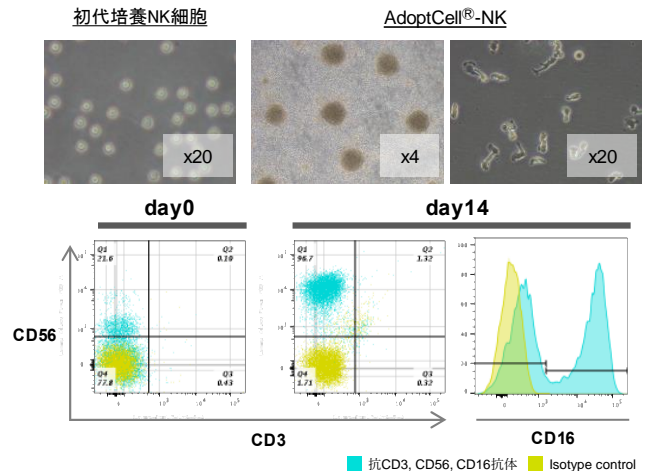
▷ 9日目

5. 培養初日で播種した細胞液量を基に、AdoptCell®-NK-F 1個あたりの総液量が50 mLになるように調製培地を加える。
(例: 12mlで開始した場合には38ml追加する)

▷ 14日目

6. 培養細胞を緩やかにプッシュボタン式液体用微量体積計で数回吸引、排出し遠沈管に回収する。
7. 適宜: 細胞が剥がれにくい場合は、AdoptCell®-NK-F 1個あたり5 mLのAdoptCell®-NK-Bを添加し、室温で3~5分間静置する。
8. 適宜: 静置後、専用培養容器の側面を軽くたたき、緩やかに吸引、排出して細胞を剥がし、6.の遠沈管に回収する。
注意: 5分を超えての処理、激しい吸引、排出操作は避ける。りん酸緩衝生理食塩水でAdoptCell®-NK-Fを洗浄し、残った細胞を6.の遠沈管に回収する。
9. 500×g、室温で5分間遠心し、速やかにりん酸緩衝生理食塩水等に置換し各種解析に用いる。

<培養例>



抗体: 使用濃度 1µg/mL

PerCP/Cy5.5 anti-human CD3 Antibody (BioLegend, 300430)

PE/Cy7 anti-human CD16 Antibody (BioLegend, 302016)

Alexa Fluor®700 anti-human CD56 Antibody (BioLegend, 318316)

PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κIsotype Ctrl Antibody (BioLegend, 400150)

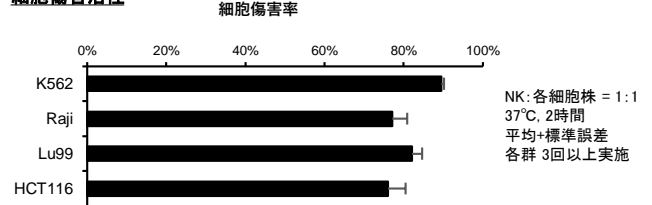
PE/Cy7 Mouse IgG1, κIsotype Ctrl Antibody (BioLegend, 400126)

Alexa Fluor®700 Mouse IgG1, κIsotype Ctrl Antibody (BioLegend, 400144)

使用機器: LSRFortessa (BD)

解析: FlowJo Ver.10.4

細胞傷害活性



細胞染色

標的細胞染色: PKH26 (SIGMA, PKH26GL-1KT)

死細胞染色: 7-AAD

使用機器: LSRFortessa (BD)

解析: FlowJo Ver.10.4

細胞傷害率 = (標的細胞死細胞率 - 自然死細胞率) / (最大死細胞率 - 自然死細胞率)

自然死細胞率: 標的細胞のみで反応

最大死細胞率: 標的細胞を10% ホルマリン等で処理

<よくあるご質問>

- 質問1. 培養後の細胞にT細胞が多く含まれてしまいます。
回答1. 培養開始時のCD3陽性細胞率を1%未満とするようにご注意ください。
また、成分採血で採取された血液を材料に用いる場合にはCD34陽性細胞も除去することをおすすめします。
- 質問2. マウスに投与するとNK細胞が死滅または失活しているようです。
回答2. ヒト血液中での安定性は確認されておりますが、NOGマウスを含むマウス血中では安定性が確認されておられません。腹腔内投与などをお試しください。

<参考文献>

1. Saito S, Harada Y, Morodomi Y, Onimaru M, Yoshida K, Kyuragi R, Matsubara H, Yonemitsu Y. *Hum Gene Ther Methods*. 24(4):241-52, 2013.
2. Harada Y, Teraishi K, Ishii M, Ban H, Yonemitsu Y. In Chapter 5: *Clinical Applications of Natural Killer Cells* Ed. by Mourad Aribi: *Natural Killer cells*. InTech pp67-105, 2017.
Available at:
<https://www.intechopen.com/books/natural-killer-cells/clinical-applications-of-natural-killer-cells>