

# γδT Cell Expansion Kit

## 产品信息

γδT细胞高效扩增试剂盒(γδT Cell Expansion Kit)			
组分名称	产品编号	规格	储存条件
γδT细胞基础培养基 (γδT cells Basal Medium)	IMC-015-BM	1 L*2	4 °C
γδT 添加剂 A	IMC-015-A	150 μL/支	-20 °C
γδT 添加剂 B	IMC-015-B	1 mL/支	-20 °C

## 适用范围

用于外周血或脐血体外诱导扩增γδT细胞。

## 产品简介

γδT细胞具有在体内快速反应的特性,在受到刺激时,会先于αβ-T细胞释放促炎性细胞因子(IFN-γ和TNF-α等)。γδT细胞能够激活NK细胞的肿瘤细胞毒作用,与DC细胞互刺激成熟,APC细胞抗原呈递的功能,激活αβ-T细胞的免疫效应,γδT细胞的杀伤作用具有非MHC限制性,广泛的杀瘤谱,已知对至少十几种肿瘤细胞有杀伤作用。γδT细胞在人外周血含量很少(1-5%),本产品能够将外周血中的单个核细胞大规模扩增成γδT细胞,具有扩增效率高,目的细胞百分比高的特点,起始单个核细胞经过14天培养,γδT细胞绝对数量最高可扩增达到1000倍,其纯度最高可达90%以上。

## 有效期

十二个月

## 样本要求

单个核细胞存活率高于90%,新鲜外周血来源的单个核细胞总数建议控制在(20-25)×10<sup>6</sup>个;脐血来源和冻存的外周血来源的单个核细胞总数建议控制在(25-30)×10<sup>6</sup>个。

## 操作步骤

### 1、所需主要试剂耗材

序号	试剂	名称	用量
1		γδT细胞基础培养基	2L
2		γδT 添加剂 A	1支,150 μL /支
3		γδT 添加剂 B	1支,1 mL/支
4		葡萄糖酸钙注射液	血浆量的8%

5	试剂	PBMC分离液	约25 mL
6		清洗液	约100 mL
7		台盼蓝	若干
8	耗材	640 cm <sup>2</sup> 培养袋	1个
9		225 cm <sup>2</sup> 培养瓶	1个
10		75 cm <sup>2</sup> 培养瓶	1个
11		15 mL离心管	约10支
12		1.5 mL离心管	若干
13		10 mL、25 mL、50 mL移液管	若干
14		200 μL移液器吸头	若干

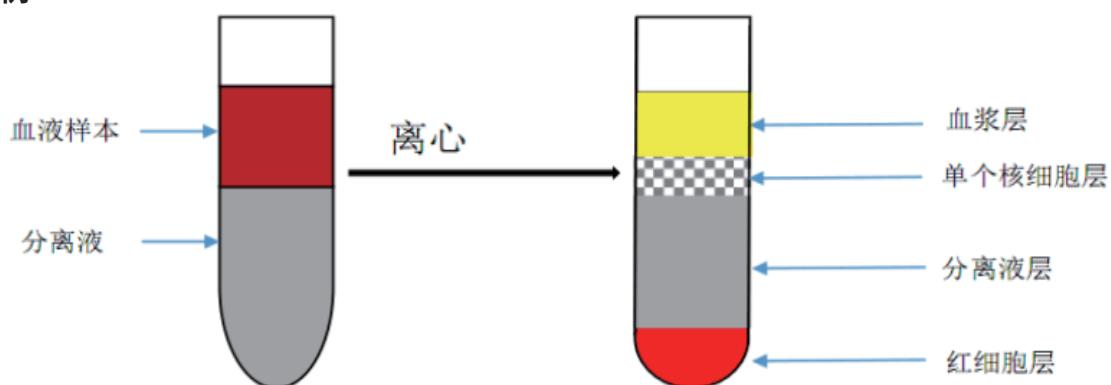
## 2、操作方法

### 2.1 血液分离

血液样本量25 mL时，实验方法如下：

- (1) 取5支15 mL离心管，各加入5 mL PBMC分离液(与血液体积相同)。
- (2) 吸取血液样本加于分离液之液面上，800 g，离心20 min，慢升慢降，若血液储存超过2小时，请将离心时间增加至30 min。
- (3) 离心后，此时离心管中由上至下分为四层。第一层为血浆层。第二层为环状乳白色单个核细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。

### 分离图例



### 2.2 灭活自体血浆

- (1) 收集上层血浆到新的离心管中；
- (2) 56 °C加热血浆30 min(可加8%葡萄糖酸钙注射液混匀后共同灭活)；
- (3) 室温下，1200 g离心10 min；
- (4) 用移液管将上清液收集至新的离心管，4 °C保存，直至使用前取出。

### 2.3 制备PBMC

- (1) 吸取第二层环状乳白色单个核细胞层到另一 15 mL 离心管中, 向所得离心管中加入 10 mL 清洗液, 混匀细胞。
- (2) 500 xg, 离心 10 min, 弃上清。
- (3) 重复洗涤3次, 弃上清。

### 2.4 γδT 细胞扩增培养

- (1) 完全培养基的配制: 500 μL γδT 添加剂B加入1 L基础培养基中。
- (2) D0: 用30 mL完全培养基重悬PBMC, 加入150 μL γδT 添加剂A , 加5%自体血浆, 铺于T75瓶中。
- (3) D3: 补加30 mL培养基(含γδT 添加剂B), 加5%自体血浆, 此时瓶子含60 mL培养基。一般情况下, 培养液颜色发生变化或细胞较多时添加。
- (4) D5: 往培养袋补加60 mL培养基(含γδT 添加剂B), 加5%自体血浆, 转入T225培养瓶, 此时瓶子含120 mL培养液。
- (5) D7: 往培养袋补加130 mL培养基(含 γδT 添加剂B), 细胞浓度控制在  $(0.8-1.0) \times 10^6$  Cell/mL, 加1%自体血浆, 转入培养袋, 此时袋子含250 mL 培养液, 细胞转袋前将培养瓶底部的细胞进行轻微吹散细胞, 切勿剧烈吹打。
- (6) D9: 往培养袋补加250 mL培养基(含γδT 添加剂B), 自体血浆按1%添加, 此时袋子含500 mL培养液。
- (7) D11: 往培养袋补加500 mL培养基(含γδT 添加剂B), 此时袋子含1000 mL培养液。
- (8) D13: 往培养袋补加1000 mL培养基(含γδT 添加剂B)。推荐细胞浓度8-9天应控制在  $(1.0-1.5) \times 10^6$  Cell/mL, 第10-11天应控制在  $(1.5-2.0) \times 10^6$  Cell/mL。

时间	Day0	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day8	Day9	Day10	Day11	Day13	Day14
处理过程	起始	不处理	不处理	加液	加液或不处理	不处理	加液	不处理	加液	不处理	不处理	加液	加液	收集
细胞状态	细胞浓度在 $0.5-1.0 \times 10^6$ Cell/mL	/	/	/	培养液颜色明显变化或细胞较多	/	细胞浓度在 $0.8-1.0 \times 10^6$ Cell/mL	细胞浓度在 $1.0-1.5 \times 10^6$ Cell/mL	细胞浓度在 $1.5-2.0 \times 10^6$ Cell/mL	/	/	/	/	
总体积(mL)	30	/	/	60	120	/	200-250	/	400-500	/	1000-1200	2000	/	

备注:由于样品个体差异、培养方式调整等因素, 培养液体积会出现上下浮动, 需要对γδT细胞生长状况进行观察分析后, 进行调整。

## 2.5 细胞收集

- (1) 培养 14 天, 扩大培养成功后取样检测细胞表型、真菌、细菌、支原体、内毒素等指标;
- (2) 收集培养 14 天后的细胞, 将细胞悬浮液从培养袋转入离心瓶, 以 680 g 离心 10 分钟;
- (3) 弃去细胞上清液, 用含有 0.1% 人血白蛋白的生理盐水悬浮细胞, 收集到一个离心瓶中。重复离心, 清洗细胞 3 次;
- (4) 通过一次性细胞筛过滤, 收集并注入含有 1% 人血白蛋白的生理盐水中。

## 注意事项

- 1、血液采集建议使用肝素钠抗凝管或枸橼酸钠采血袋。
- 2、自体血浆会影响细胞的培养状态, 建议自体血浆预留量为 30 mL 左右。溶血、高脂肪可能会影响 $\gamma\delta T$  细胞的扩增。
- 3、前 7 天补液时, 必须将培养基进行室温平衡或者水浴箱温育培养基, 避免低温对细胞生长的影响。
- 4、如果试剂外包装管出现裂缝, 应立即停止使用。
- 5、应严格按照贮存要求贮存。
- 6、操作过程应在无菌环境下进行, 必须保证操作过程中使用的所有容器及所有直接接触细胞液的器具严格无菌。
- 7、本试剂开封后必须一次性使用完毕, 不得反复冻融。
- 9、细胞培养过程中, 培养前 7 天出现细胞成团属于正常现象, 操作过程请注意不要破坏细胞团。
- 10、实验过程中产生的洗涤液和各种废弃物应根据相应法规和地方监管部门要求进行处理。