

T 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

T Cell Robust Expansion Kit

(货号：664070)

1. 产品介绍

- 1.1 本产品是一款 T 细胞高效扩增的试剂盒。外周血/脐带血中的 PBMC 细胞经本试剂盒处理后，在 14-16 天时间内，细胞总数可达到 8×10^9 - 1×10^{10} ，细胞存活率 90%以上，扩增倍数在 500-1000 倍，T 细胞比例最高可达 90%以上。
- 1.2 本试剂盒适用于人外周血/脐带血和经过血细胞单采仪处理获得的白细胞等来源的样品。
- 1.3 本试剂盒是在符合相关规范的无菌环境中生产，并已通过了严格的细菌、真菌、支原体、病毒(HIV、HAV、HBV、HCV)、内毒素检测。本试剂盒不含血浆、动物源成分以及其它不明确成分。

2. 材料和设备

2.1 试剂盒套装组成

套装内容	单位	数量	保存条件	产品性状
T Cell Culture Medium(664071)	瓶	2	2-8℃	液体
T-A (664072)	支	1	-20℃	液体
T-B (664073)	支	1	-20℃	液体
T-C (664074)	支	2	-20℃	冻干粉

2.2 用户需要自行准备的试剂耗材

0.4%苔盼蓝溶液、生理盐水、人淋巴细胞分离液、肝素钠采血管/100ml 采血袋、PBS、75cm² 悬浮培养瓶、175cm² 培养瓶、细胞培养袋（NIPRO）、15mL/50mL/250mL 离心管、移液管、5mL 和 50mL 无菌注射器等。

3. 样本采集及运输要求

- 3.1 外周血样本采集应为肝素钠/肝素锂采血管，脐带血优先选择 100ml 采血袋，采集过程应严格规范无菌。实际采血总量应大于 50ml，采集后血液与抗凝剂应及时混匀。
- 3.2 样本运输条件为 18-25℃，24 小时处理样本。

4. PBMC 的分离和血浆制备（以 50ml 样本 THERMO ST16 离心机为例）

- 3.3 将 50ml 血液样本均分至 2 个 50ml 离心管，3000rpm，10min，取上层血浆转移至新的离心管，56℃，

30min 灭活，4℃静置 10min，3000rpm，10min，用吸管将上清液转移至新的离心管中，-20℃保存，使用前取出；

3.4 剩下细胞加入生理盐水至原体积，充分混合均匀，转移至 2 个装有 15ml 淋巴细胞分离液的 50ml 离心管中，室温下 1800rpm，30min；

3.5 取出 PBMC 至新的 50ml 离心管；加入生理盐水至 45ml，1600rpm，8min；

3.6 去上清，加入生理盐水至 45ml，充分混匀，取样计数；

3.7 1400rpm，10min 收集 PBMC。

5. 培养基使用说明：

每瓶培养基 {T Cell Culture Medium (664071)} 加入一支 T-C (664074)，混匀，使用前恢复至室温。

6. 细胞接种

6.1 取 45ml 已配置培养基加入 5ml 自体血浆（不含抗凝剂体积）和一支 T-A (664072)混匀待用。

6.2 用混匀后的培养基重悬已经收集好的单个核细胞；细胞密度应大于 $1.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ；

6.3 转移混匀后的细胞悬液至悬浮细胞培养瓶，在缓慢平放于培养箱中培养。

6.4 24 小时候后加入一支 T-B (664073)。

7. 补液

6.5 D3，镜下观察有较多克隆团出现，即可补液，如有大量较大的克隆团，可适当打散（下同），转移细胞至 T175 培养瓶中，补加 45ml 已配置培养基，5ml 自体血浆混匀；

6.6 D5，补加 110ml 已配置培养基，自体血浆 10ml，混匀；

6.7 D7，补加 200ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀；均分于 2 个细胞培养袋；

6.8 D9，往细胞培养袋补加 400ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分于 2 个细胞培养袋；自体血浆如用完可不添加或用 Cell Culture Supplemental Mix (Special For Immune Cells; 666072) 替代（下同）；

6.9 D11，往细胞培养袋补加 800ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分于 2 个细胞培养袋；

6.10 D13，往细胞培养袋补加 400ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分于 2 个细胞培养袋；

8. 收获

D14 收获 T 细胞，可根据实验情况，适当提前或延迟。