

人调节 T 细胞高效扩增试剂盒使用说明书（2.0 版）

【产品名称】

中文名称：人调节 T 细胞高效扩增试剂盒

英文名称：Human Treg cell robust expansion kit

【编号】

91-02-0110

【包装规格】

1L/套

【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
人 Treg 细胞富集抗体	无色透明液体	200μL/支	1 支
链霉亲和素磁珠	棕色混悬液	200μL/支	1 支
Treg-I	无色透明液体	1mL/支	1 支
Treg-II	黄色略浑浊液体	1mL/支	1 支
Treg-III	黄色澄清液体	1mL/支	1 支
Treg 无血清培养基	橙色澄清液体	1L/瓶	1 瓶

【预期用途】

适用于从人新鲜外周血，脐血，浓缩白细胞来源的单个核细胞以及冻存形式单个核细胞在体外扩增成 Treg 细胞。

【贮藏条件与有效期】

试剂盒中人 Treg 细胞富集抗体，链霉亲和素磁珠，Treg 无血清培养基均置于 2-8℃ 保存，Treg-I，

苏州欣协生物科技有限公司

电话：0512-63037851

网址：www.xinbiotech.cn

邮箱：info@szxxbio.com

Treg-II, 及 Treg-III 置于-20℃ 保存, 有效期均为 12 个月;

有效期见外标签。

【产品简介】

调节 T 细胞(Regulatory cell,简称 Treg)是一类控制体内自身免疫反应的 T 细胞亚群。它与自身免疫性疾病的发生关系密切,其异常表达可导致自身免疫性疾病。体外培养获得调节 T 细胞是免疫学研究的重要原材料,再体外获得数量足够的调节 T 细胞亦是控制自身免疫性疾病和降低 GVHD 促进移植耐受的关键手段。本产品用于从单个核细胞(MNC)在体外高效扩增成 Treg 细胞,具有使用简便,目的细胞百分比高的特点,起始 CD4+T 细胞经过 6 天培养,Treg 细胞纯度可达 90%以上。

【操作步骤】

一 T75 瓶包被

将 7mL PBS 或生理盐水加入到经过 TC 处理的 T75 细胞培养瓶中,再将 1mL 的 Treg-I 加入到 T75 瓶的 PBS 或生理盐水中(可再吸取 1mL 的 PBS 或生理盐水润洗试剂管壁后加入到 T75 瓶中),迅速充分混匀后,将细胞培养瓶水平静置于二氧化碳培养箱 37℃ 包被 2h(不能低于 1h),或封口膜封口后置于 2-8℃ 包被过夜。

注意:

- 1) 细胞培养瓶必须是经 TC 处理的培养瓶;
- 2) 建议采用平底的细胞培养瓶,而非斜肩的培养瓶,以增加初始细胞的诱导比例;
- 3) 包被培养瓶时要水平放置,并使包被液始终完全覆盖培养瓶底面;
- 4) 若包被瓶未能及时使用,可将培养瓶用封口膜封口,置于 2-8℃ 保存 2 天。

二 血浆的提取与保存

注意:

苏州欣协生物科技有限公司

电话: 0512-63037851

网址: www.xinbiotech.cn

邮箱: info@szxxbio.com

- 1) 禁止使用 EDTA 抗凝的血样，因为 EDTA 会极大影响调节 T 细胞的激活与增殖；
- 2) 所取血样最好不超过 12 小时，因为血样的时间越长，所提取的 PBMC 中杂细胞越多，且 PBMC 的活性会降低；

- 1 将取到的外周血置于 50mL 离心管中，室温下 650g，离心 15min；
- 2 取上层黄色血浆部分于新的 50mL 离心管中（下层为血液细胞，用于后续单个核细胞的提取）；
- 3 将血浆置于 56℃ 水浴锅中灭活 30min；
- 4 血浆灭活完毕后，可见血浆呈现浑浊状，900g，离心 10min，取上清，于 4℃ 保存待用；

三 单个核细胞的提取

- 1 取血浆提取步骤的下层红色细胞沉淀，加入生理盐水或 PBS 至原体积，轻柔吹打均匀；
- 2 取 50mL 离心管，加入 15mL 淋巴细胞分离液，并将 1 步骤中的稀释血液分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层；

注意：铺加血样时建议速度适中，尤其是刚开始时的铺加，避免破坏淋巴细胞分离液与血样的界面。

- 3 室温下，800g 离心 20min（无闸减速）；
- 4 离心后，离心管中样品由上到下分为 4 层：血浆层-白膜层-人淋巴细胞分离液层-红细胞与粒细胞的沉淀。分别小心吸取白膜层及其以下约一半的液体于新的离心管中，并加入生理盐水或 PBS 至 40mL 体积，混匀，300g 离心 10min；
- 5 弃上清，沉淀再次用 40mL 的生理盐水或 PBS 重悬，300g 离心 10min；

注意：对于血小板较多的样本可重复 5 步骤 1-2 次。

- 6 弃上清，沉淀用少许缓冲液重悬，取部分细胞悬液计数，备用。

四 种子细胞富集

注意：整个细胞分离过程可大致分为抗体孵育-洗涤-磁珠孵育-磁吸等步骤，其中抗体孵育在离心管操作即

可，磁珠的孵育与磁吸等则转移至流式管中操作。

1 调整细胞密度与预冷：PBMC 悬液离心去上清，加入一定量的 Treg 无血清培养基，将 PBMC 浓度调整为 1×10^8 cells/mL；

2 富集抗体孵育：将富集抗体以 200uL 抗体/ $1-1.5 \times 10^8$ 初始 PBMC 的比例将加入细胞悬液中，迅速用移液枪轻柔吹打，充分混合后室温孵育 15min；

3 未结合抗体的洗涤：孵育完毕后，加入 Treg 无血清培养基 (1×10^8 cells /10-40mL)，300g 离心 10min，弃上清，加入一定量的 Treg 无血清培养基，使细胞悬液体积回复到初始时的水平；

注意：弃上清时，往往在管口处残留些许缓冲液，尽可能将这些残留液用移液枪等吸取干净，必要时可再次洗涤，避免残留液中的部分抗体成分对后续的磁珠与细胞的结合产生干扰。

4 磁珠孵育：将细胞悬液转移至流式管，以 100uL 磁珠/ 1×10^8 初始 PBMC 的比例将链霉亲和素磁珠加入到 PBMC 中，迅速用移液枪轻柔吹打均匀，室温孵育 10min；

5 磁吸：孵育完毕后，磁吸 3min，收集未磁吸的细胞悬液；

注意：若磁吸时细胞量较少，可加入 1mL 的 Treg 无血清培养基重悬细胞后再磁吸。

6 再次磁吸：往含磁吸细胞的流式管中加入与第 5 步同体积的 Treg 无血清培养基，轻柔吹散磁珠后再次磁吸 3min，收集未磁吸的液体并与第 5 步中所收集的细胞悬液合并；

7 去除非目的细胞：将合并的细胞悬液重复磁吸数次，收集未磁吸的细胞悬液，用以更完全的去除非目的细胞，所得细胞即为富集的种子细胞。

五 包被后培养瓶的洗涤

孵育完毕后，将培养瓶置于无菌环境中，立起培养瓶，从培养瓶的底角吸去包被液，再用 10mLPBS 或生理盐水从培养瓶包被面的对立面注入瓶内，放平后，轻柔摇晃洗涤细胞培养瓶，再次立起培养瓶，从底角处弃去清洗液，待用。

注意：1) 洗涤包被液时不要触碰或冲洗到包被面；

2) 培养瓶清洗后需要尽快接种，防止培养瓶变干。

六 调节 T 细胞的诱导（以 $5-6 \times 10^7$ 种子细胞为例）

1 第 0 天，配制 30mL 调节 T 细胞完全培养基：Treg 无血清培养基 26mL，10%已热灭活的自体血浆（3mL），1mL 的 Treg-II，以及 IL-2（完全培养基中 IL-2 终浓度为 500IU/mL），将该完全培养基与种子细胞混悬均匀后接种于已包被好的 T75 瓶中；

2 第 4-5 天，补加 Treg 细胞完全培养基 30mL：Treg 无血清培养基 27mL，10%已热灭活的自体血浆（3mL）以及 500U/mL 的 IL-2；

3 第 6-7 天，补加 Treg 细胞完全培养基 60mL：Treg 无血清培养基 53mL，10%已热灭活的自体血浆（6mL），1mL 的 Treg-III 以及 500U/mL 的 IL-2；

4 第 8-9 天，补加 Treg 细胞完全培养基 120mL：Treg 无血清培养基 108mL，10%已热灭活的自体血浆（12mL）以及 500U/mL 的 IL-2；

5 第 10-11 天，补加 Treg 细胞完全培养基 240mL：Treg 无血清培养基 216mL，10%已热灭活的自体血浆（24mL）以及 500U/mL 的 IL-2；

6 第 12-13 天，补加剩余 Treg 无血清培养基，剩余已热灭活的自体血浆以及 500U/mL 的 IL-2；

7 第 14-15 收获 Treg 细胞进行分析检测或下游应用。

【注意事项】

1 使用本试剂盒前，可选择先将装有各因子的试剂管离心（如 1000g/min 离心 1min 等），确保试剂足量；

2 禁止使用含有 EDTA 抗凝剂采血获得的自体血浆；

3 每支 IL-2 使用 1mL Treg 无血清培养基溶解后，可存于 2-8℃ 冰箱，存放时间不超过两周，建议将 IL-2 溶解后分装于无菌试剂管后保存于 -20℃ 冰箱，使用时溶解即可，注意不要反复冻融，且不可使用长期置于 2-8℃ 的 IL-2，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果；

4 在细胞接种后与第 4-5 天补液之前的这段时间内，尽可能不要移动培养瓶，以免使其受到温度变动，震荡等物理因素的干扰。

5 Treg 无血清培养基在使用前，需先将其室温平衡 30min 以上，切勿将培养基直接从冰箱中拿出使用，否则可能导致细胞出现应激反应。

6 由于样本之间的差异性，在按上述说明操作时，可根据具体细胞生长状态，调整补液时间；在使用本试剂盒时，由于样本之间的差异性，每个样本的细胞长速与诱导率存在差异。

