

hyperClone® Human $\gamma\delta$ T cell Activation/Expansion Cocktail **$\gamma\delta$ T 细胞激活扩增操作说明书****一、 实验前准备**

- ① 耗材：T75 培养瓶 (TC treated)； T175 培养瓶，细胞培养袋，移液管、离心管等耗材；
- ② 试剂：20%HSA, DPBS 或生理盐水, novaT-15 培养基 (4 度保存), hyperClone® Human $\gamma\delta$ T cell Activation/Expansion Cocktail, $\gamma\delta$ T 细胞激活扩增试剂盒 (-20 度保存)；
- ③ 设备：迷你离心机，大容量离心机，水浴锅，培养箱等；
- ④ 40-50ml 新鲜外周血或冻存的单个核细胞；

二、 d-1/d0 天 包被培养瓶：

- ① 取 T75 培养瓶一个，加入 5ml DPBS，取 $\gamma\delta$ T Coating Factor Cocktail 一支融解，融解后用瞬时离心机离心，以便减少粘壁损失，加入到 DPBS 中混匀，封口膜封口后置于 4°C 冰箱，静置包被 16h 以上，第二天使用；
- ② 或放置于 37 度培养箱 2 小时以上，快速包被；

三、 d0 天血样分离 原代培养**1、准备工作：**

- ① 新鲜采集外周血 40-50ml (5 管)，单采血或冻存 PBMC 亦适用；
- ② Ficoll 如从冰箱取出，务必复温到室温；

2、分离制备自体灭活血浆：(单采或冻存 PBMC 可以用血小板裂解物替代)

- ① 离心：取抗凝血 40-50ml 转移到 50ml 离心管，全血以 1000g，离心 15 min；
- ② 灭活：水浴锅 56°C，30min 灭活血浆，每隔 10 分钟晃动一下离心管；
- ③ 离心备用：灭活后，置于 -20°C 存放 15min；再次离心 2100g，30min，取上层血浆至离心管，4 °C 保存备用。

3、Ficoll 离心分离单个核细胞

- ① 将血浆提取步骤中所得的下层细胞样本用配制的稀释液(DPBS+5%HSA)稀释到 90ml，用 25ml 离心管轻轻吹打混匀。
- ② 取 50ml 离心管，各加入 15ml 的 Ficoll 溶液，用 25ml 移液管铺层，按照 2:1 的比例将血液小心加入到 Ficoll 层上。1200g 离心 20min，缓升缓降，缓升为 1，缓降为 0。

- ③ **γδT 细胞分离制备：**小心吸取白膜层到预加洗液 20ml 的 50ml 离心管，300g，离心 10min（缓升 8，缓降 6）；弃上清，重复如上步骤再洗涤一次；用基础培养基（分装 20ml novaT-15 专用培养基，原代接种用该分装的培养基）重悬细胞，取样细胞计数。
- ④ **洗涤培养瓶：**取预先包被的 T75 培养瓶，用洗液（含 HSA）洗涤两次包被面，注意用移液管先加到对面，勿直接冲刷包被面，倒掉 DPBS 后备用。

四、 γδT 细胞接种 D0 天激活：

细胞总数量在 $1-10 \times 10^7$ 之间都统一加入 20ml 分装预热的初始培养基，轻轻吹打混匀，加入 10% 灭活自体血浆 2ml（或血小板裂解物），加入一支 γδT Stimulation Factor Cocktail 1 和一支 γδT Stimulation Factor Cocktail 2。置于培养箱静置培养三天。如细胞量较多，则 d2 天观察培养液颜色以便确定是否可以补液。

五、 d2 或 d3 补液

- d2 或 d3，显微镜观察细胞状态，如细胞融合度超过 50%，有中等以上细胞团块较多，则进行等量补液完全培养基。注意培养基颜色千万不可变的太黄；培养基颜色微黄时需要及时补液；
- 配制完全培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 Expansion Factor Cocktail 1；

六、 扩增培养

以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，适时进行扩瓶，扩瓶时细胞融合度要大于 80%。

T75 培养瓶补液加 10% 血浆，T175 培养瓶补液加 5% 血浆，全程保持入袋后 2% 血浆或血小板裂解物的添加，自体血浆用完可以用血小板裂解物。

视细胞增殖状况进行补液和扩瓶，一般等量补液，细胞增殖旺盛也可以双倍补液。

当细胞扩增到一定数量可启动回输。

质控点：回输前 3 天，检测无菌，支原体。

最后一次补液，间隔两天再收获细胞，使细胞密度提升上来，培养基营养充分利用。