

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：DPBS 或生理盐水，novaT-36 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 kit08 (-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 10ml DPBS，取 $\gamma\delta$ T 包被因子 A 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：(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；
- 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、 $\gamma\delta$ T 细胞纯化 ($\alpha\beta$ T 细胞去除)

- ① 将血浆提取步骤中所得的下层细胞用生理盐水或 DPBS 稀释到 45ml，轻轻吹打混匀 (25ml 移液管)，加入一支 kit08 $\gamma\delta$ T 纯化因子 C Purification Factor Cocktail，轻轻颠倒混匀，室温孵育 20min 后，用等量的生理盐水或 DPBS 重悬到 90ml (分两个 50ml 离心管)，轻轻颠倒混匀，不可吹打，防止吹打开已经形成的红细胞团簇。

- ② 取 50ml 离心管，各加入 15ml 的 Ficoll 溶液，按照 2:1 的比例将血液小心加入到 Ficoll 铺层。
- ③ 1200g 离心 20min，缓升缓降，缓升为 1，缓降为 0。
- ④ 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；
- ⑤ 配制完全培养基：novaT-36 基础培养基 1L，加入一支 **γδT 扩增因子 D** Expansion Factor Cocktail；
- ⑥ 用 20ml 完全培养基重悬细胞，取样细胞计数。
- ⑦ 取预先包被的 T75 培养瓶，用 DPBS 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 预热的完全培养基，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 激活因子 B** Stimulation Factor Cocktail。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；

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，保持入袋后 2% 血浆的添加直至用完。

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。

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。