

T细胞无血清培养基使用说明书

实验前准备提醒:

本培养基是一款无需添加人血或是血替直接使用的无血清完全培养基。但如果实验需求也可酌情添加5%人AB血清。同时,本培养基不含抗生素,可自行根据实验需求添加庆大霉素或者青/链霉素。

细胞因子如IL-2可以直接添加到培养基中,不影响因子活性和后续细胞的扩增(但已添加IL-2的培养基,最长冷藏期限不建议超过两周)。其它细胞因子如IL-7, IL-15, 建议在培养时另行单独添加。

下面以冷冻的PBMC 为例进行T淋巴细胞扩增实验(使用CD3/CD28磁珠/IL-2)

细胞来源: 外周血单个核细胞或者分离纯化的T细胞(新鲜分离或者冷冻保存)

第0天

1. 在15毫升的离心管中,加入10毫升的T无血清完全培养基,预热至37°C度。
2. 取出冷冻的PBMC细胞,在37度水浴中解冻,轻轻晃动冻存管,使得冰晶快速融解,确保细胞在2分钟内完全解冻。
3. 转移细胞至含有10毫升预热完全培养基的离心管中。
4. 离心, 300g x 5 分钟, 弃去上清。
5. 加入10毫升预热的T无血清完全培养基,或者预热的细胞清洗液(豪科清洗液,货号: S301-500)
6. 离心, 300g x 5 分钟, 弃去上清。
7. 加入适量的预热完全培养基,轻柔重悬细胞。取一小份细胞,加入等量的台盼蓝溶液,加入到细胞计数板中,镜下计数和细胞活率(冻存细胞复苏后要保证90%的细胞活率)。
8. 添加适量的培养基至 $1-1.5 \times 10^6$ PBMC cells/毫升, 可根据实验需要,添加5%的人AB血清。
9. 转移PBMC细胞悬液到12孔板中,添加1毫升细胞/孔。
注: 根据实验需要,起始细胞量,调整使用不同大小的培养板或者培养瓶。
10. 根据PBMC细胞量添加 CD3/CD28活化磁珠(PBMC中含有 45-70%左右的T淋巴细胞,每1百万PBMC添加50万CD3/CD28磁珠颗粒)
11. 按 100U/毫升,添加白介素 2 (IL-2), 转移培养板或培养瓶到细胞培养箱, 37度, 5%的二氧化碳,放置48小时。
注: 高浓度白细胞IL-2, >300U/毫升,容易造成后期扩增阶段T细胞耗竭,终末分化,同时也会增加Treg的比例。

第2-14天

13. 第二天添加相同的体积的无血清培养基 +IL-2 (100U/毫升)。
14. 根据计数或者培养基颜色变黄添加新鲜培养基,如培养基颜色变黄明显,则每天添加等量新鲜培养基。
15. 第5-7天时,需要去除活化磁珠(将细胞转移到离心管中,轻轻打匀。将离心管放置到一个磁力吸附装置中,活化磁珠吸附到离心管壁上,转移细胞悬液到另一个离心管/培养瓶中,取一小份进行细胞计数)。
16. 按计数结果添加带有IL-2的新鲜培养基,调整细胞浓度至适当范围(前期调整到 $0.8-1.0 \times 10^6$ 细胞/毫升,第9天以后细胞浓至 $1.2-1.5 \times 10^6$ 细胞/毫升。)
17. 第14天,收取细胞进行后续实验和细胞表型分析。

其他备注:

- ❖ 慢病毒转染生产特异的CAR-T细胞,请根据实验需求和转染方案,按上述扩增进行调整。
- ❖ CD3/CD28活化磁珠+IL-2扩增方案,用本培养基扩增后会得到更多的效应性T细胞。
- ❖ CD3/CD28活化磁珠+IL-7/IL-15扩增,用本培养基制备后会得到更多的带有记忆表型的T细胞。