

# 人调节 T 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

## 【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】

CT-011

## 【包装规格】

1L/套，可用于培养 200mL 样本所得 CD4<sup>+</sup>细胞

## 【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
人 Fc 受体阻断剂	无色透明液体	400 $\mu$ L/支	1 支
人 CD4 细胞生物素化抗体	无色透明液体	400 $\mu$ L/支	1 支
链霉亲和素磁珠	棕色混悬液	200 $\mu$ L/支	1 支
细胞分选缓冲液	无色透明液体	100mL/瓶	1 瓶
Treg-I	无色透明液体	10 $\mu$ L/支	1 支
Treg-II	红色透明液体	15 $\mu$ L/支	1 支
Treg-III	黄色透明液体	10 $\mu$ L/支	1 支
Treg-IV	无色透明液体	20 $\mu$ L/支	1 支
Treg-V	红色透明液体	25 $\mu$ L/支	1 支
Treg-VI	黄色透明液体	15 $\mu$ L/支	1 支
Treg-VII	无色透明液体	30 $\mu$ L/支	1 支
Treg-VIII	红色透明液体	40 $\mu$ L/支	1 支
Treg-IX	黄色透明液体	25 $\mu$ L/支	1 支
Treg 培养基	红色澄清液体	1L/瓶	1 瓶

## 【预期用途】

适用于从人新鲜外周血、浓缩白细胞、脐血来源的单个核细胞以及冻存的单个核细胞在体外扩增成调节 T 细胞。

## 【贮藏条件与有效期】

试剂盒中生物素化抗体，链霉亲和素磁珠，Fc 受体阻断剂，细胞分选缓冲液，Treg-I, Treg-IV, Treg-VII, Treg 培养基置于 2-8°C 保存，Treg-II, Treg-III, Treg-V, Treg-VI, Treg-VIII, Treg-IX 置于 -20°C 保存，有效期均为 12 个月；

生产日期，有效期至：见标签；

## 【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。体外培养获得调节 T 细胞是免疫学研究的重要原材料，在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技术手段。本产品用于从 CD4 naive T 细胞在体外高效扩增成 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 9 天培养，Treg 细胞纯度可达 70%以上。

## 【操作步骤】

### 一 血浆的提取与保存

注意：

- 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（下层为血液细胞成分，用于后续单个核细胞的提取）；
- 3 将血浆置于 56°C 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；
- 5 取上清，于 -20°C 冷冻 15min；
- 6 冷冻完毕后，再次 900g，离心 10min，取上清，于 4°C 保存待用。

## 二 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。

## 三 CD4+T 细胞的富集

**注意：**整个细胞分离过程可大致分为 PBMC 洗涤-Fc 受体阻断剂孵育-抗体孵育-洗涤-磁珠孵育-磁吸等步骤，其中，PBMC 洗涤，Fc 受体阻断剂孵育，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 PBMC 洗涤：**往 PBMC 中加入预冷的细胞分选缓冲液（ $1 \times 10^8$  cells / 10mL），300g 离心 10min；

**2 调整细胞密度与预冷：**弃上清，加入一定量的预冷的细胞分选缓冲液，将 PBMC 浓度调整为  $1 \times 10^8$  cells/mL；

**注意：**若所分离的细胞数量过少，例如只有  $1 \times 10^7$  cells，则可将细胞密度调整为  $5 \times 10^7$  cells/mL。

**3 Fc 受体阻断剂孵育：**将 Fc 受体阻断剂以 200uL/ $1 \times 10^8$  cells 的比例加入到 PBMC 中，迅速用移液枪轻柔吹打，充分混合后置于 4°C 孵育 5min；

**4 生物素化抗体孵育：**Fc 受体阻断剂孵育完毕后，将生物素化抗体以 200uL 抗体/ $1 \times 10^8$  初始 PBMC 的比例将加入细胞悬液中，迅速用移液枪轻柔吹打，充分混合后置于 4°C 孵育 15min；

**5 未结合抗体的洗涤：**孵育完毕后，加入细胞分选缓冲液（ $1 \times 10^8$  cells / 10-40mL），300g 离心 10min 后，弃上清，加入一定量的细胞分选缓冲液，使细胞悬液体积恢复到初始时的水平；

**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，必要时可再次用缓冲液洗涤，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。

**6 磁珠孵育：**将细胞悬液转移至流式管，以 100uL 磁珠/ $1 \times 10^8$  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，4°C 孵育 10min；

**7 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 的细胞分选缓冲液重悬细胞后再磁吸。

**8 再次磁吸：**加入与第 7 步同体积的细胞分选缓冲液，轻柔吹散磁珠后再次磁吸 3min，收集未磁吸的液体并与第 7 步中所收集的液体合并；

**9 将合并的细胞悬液重复磁吸一次，收集未磁吸的细胞悬液；**

**10 将所得未磁吸的细胞悬液用 PBS 或生理盐水 300g 离心 10min 洗涤一次，去除细胞分选缓冲液成分，所得细胞即为富集的 CD4+ T 细胞。**

**注意：**细胞接种前需去除细胞分选缓冲液成分。

#### **四 调节 T 细胞的诱导（以 $2.5 \times 10^7$ 起始 CD4+T 细胞为例）**

**1 第 0 天，**配制 50mL 调节 T 细胞完全培养基：Treg-V 培养基 45mL，10%已热灭活的自体血浆或 FBS（5mL），Treg-I 因子 4 $\mu$ L，Treg-II 因子 5 $\mu$ L，Treg-III 因子 3 $\mu$ L 以及 100U/mL 的 IL-2。将富集好的 CD4+T 细胞按  $0.5 \times 10^6$ /mL 细胞密度接种于含有 50mL 调节 T 细胞完全培养基的 T-75 细胞培养瓶中。

**注意：**1) 所用 T75 培养瓶为非 TC 处理类型；

2) Treg-III 因子用 1mL 自体血浆或 FBS 反复吹打溶解均匀后，再添加到培养基中，切勿将 Treg-III 因子直接加到培养基中；

**2 第 4-5 天（ $4 \times 24$ h 后），**补加调节 T 细胞完全培养基 100mL：Treg 培养基 90mL，10%已热灭活的自体血浆或 FBS（10mL），Treg-IV 因子 8 $\mu$ L，Treg-V 因子 10 $\mu$ L，Treg-VI 因子 6 $\mu$ L 以及 100U/mL 的 IL-2；

**注意：**Treg-VI 因子用 1mL 自体血浆或 FBS 反复吹打溶解均匀后，再添加到培养基中，切勿将 Treg-VI 因子直接加到培养基中；

**3 第 6-7 天，**补加调节 T 细胞完全培养基 150mL：Treg 培养基 135mL，10%已热灭活的自体血浆或 FBS（15mL），Treg-VII 因子 12 $\mu$ L，Treg-VIII 因子 15 $\mu$ L，Treg-IX 因子 9 $\mu$ L 以及 100U/mL 的 IL-2；

**注意：**1) 不同样本调节 T 细胞长速不一样，可根据具体细胞生长情况调整补液体积；

2) Treg-IX 因子用 1mL 自体血浆或 FBS 反复吹打溶解均匀后，再添加到培养基中，切勿将 Treg-III 因子直接加到培养基中；

**4 第 8-9 天，**收获 Treg 细胞进行分析检测或下游应用。

**注意：**在培养过程中，调节 T 细胞的比例在第 7 天达到峰值，之后随着培养时间的延长其比例逐渐降低，建议培养时间不超过 9 天。

### 【注意事项】

- 1 每个样本的单个核细胞含量，单个核细胞中 CD4<sup>+</sup>细胞的含量，细胞增殖活性等均有差异，可根据具体情况结合实验所需调整初始培养基体积以及后续补液体积；
- 2 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；
- 3 每支 IL-2 使用 1mL Treg 培养基溶解后，可存于 2-8°C 冰箱，存放时间不超过 1 周。建议将 IL-2 溶解后分装于无菌试剂管后保存于-20°C 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°C 的 IL-2，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果；
- 4 Treg 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。

本试剂盒无配备 IL-2，客户需自行购买添加。

### 【产品性能指标】

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

### 【生产企业】

企业名称：福建三一造血技术有限公司

生产地址：福建省福州市高新技术产业园创新园 10 号楼

邮政编码：350108

电话号码：（0591）22889285/4001155980

邮箱地址：sales@stemery.cn

网址：<http://www.stemery.cn>

