人调节 T 细胞高效扩增试剂盒（套装）使用说明书（2.0）

【产品名称】

中文名称：人调节 T 细胞高效扩增试剂盒（套装）（2.0）

英文名称：Human Treg cell robust expansion kit（set)（2.0）

【编号】

CT-011

【包装规格】

1L/套

【套装组成】

序号	组成名称及货号		物理性状	规格	数量
1	人调节 T 细胞高效扩增试剂盒（CT-011-R）	人 Treg 细胞富集抗体 (CT-011-R1)	无色透明液体	200μL/支	1 支
		链霉亲和素磁珠 (CT-011-R2)	棕色混悬液	200μL/支	1 支
		Treg-I (CT-011-R3)	无色透明液体	1mL/支	1 支
		Treg-II (CT-011-R4)	黄色略浑浊液体	1mL/支	1 支
		Treg-III (CT-011-R5)	黄色澄清液体	1mL/支	1 支
2	Treg 细胞无血清培养基 (CT-011-6)		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来源的单个核细胞在体外扩增 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 细胞无血清培养基均置于 2-8°C 保存，Treg-I，Treg-II，及 Treg-III 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，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，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手段。本产品用于从单个核细胞（MNC）在体外高效扩增 Treg 细胞，具有使用简便，目的细胞百分比高的特点，经过 14 天培养，Treg 细胞纯度可达 90%左右。

【操作步骤】

一 T75 瓶包被

将 8mL PBS 或生理盐水加入到经过 TC 处理的平底 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），“8”字或“十”字迅速充分摇晃均匀后，使溶液均匀的铺满瓶底，将细胞培养瓶水平静置于二氧化碳培养箱 37°C 包被 2h（不能低于 1h），或封口膜封口后置于 2-8°C 包被。

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°C 保存 2 天。

二 血浆的提取与保存

1.将血样置于 50mL 离心管中，室温下 650g，离心 15min；（快升缓降：离心机升速 9，降速 1）；

注意：本说明书提到的的离心机上的数字越大表示速度升得越快或降得越快，数字越小表示离心机升得越慢或降得越慢，但有厂家仪器设置则相反。

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；（快升缓降：离心机升速 9，降速 4）；

5.取上清，于 2-8°C 保存待用。

注意：

1）禁止使用 EDTA 抗凝的血样，因为 EDTA 会极大影响 Treg 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，所提取的单个核细胞中杂细胞越多，且单个核细胞的活性会降低；

3）如遇以下情况不能顺利获得足量合格血浆建议选购我司血替产品（Cat No：RC-002）以保证 Treg 细胞良好增殖：

A.使用了种类和数量不恰当的抗凝剂，如使用 EDTA 抗凝剂或者枸橼酸钠抗凝剂过多；

B.个体差异导致提取的血浆对应体积减少或质量下降；

C.需要使用不带血浆的冻存单个核细胞作为种子细胞，尤其在使用商品化的脐血单个核细胞中常见；

D.其他任何原因导致无法取得足量合格血浆。

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 至血样原体积；

注意：脐血样本由于红细胞较多，可在吸取血浆后，将剩余细胞稀释到血样原体积的 1.5-2 倍，有助于去除更多红细胞，例：血样有 40mL，获得血浆 15mL，这时候可加入生理盐水或者 PBS 至 60-80mL。

2.取 2 支 50mL 离心管，分别加入 15mL 淋巴细胞分离液，并将 1 步骤中的稀释血液按 20-30mL/管，分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层；

注意：铺加血样时，尤其是刚开始时的铺加，应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（离心机缓升，无闸减速，升速 1-5）；

注意：

1）脐血样本的离心时间可延长至 30min；

2）过快的升速会减少后续单个核细胞的收获量。

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；（离心机快升缓降：升速 9，降速 4）

5.弃上清，沉淀再次用 40mL 的生理盐水或 PBS 重悬，300g 离心 10min；（离心机快升缓降：升速 9，降速 4）

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，沉淀用少许复温后的 Treg 细胞无血清培养基重悬，合并所有离心管的沉淀至一支离心管内定容至 45mL，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中操作即可，磁珠的孵育与磁吸等则转移至无菌流式管中操作。

1 调整细胞密度：单个核细胞悬液离心去上清，加入一定量的 Treg 细胞无血清培养基，将单个核细胞浓度调整为 1×10^8 cells/mL；

2 富集抗体孵育：将富集抗体以 200μL 抗体/1-1.5$\times10^8$ 初始单个核细胞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 细胞无血清培养基（1×10^8cells /10-40mL），300g 离心 10min，弃上清，加入一定量的 Treg 细胞无血清培养基，使细胞悬液体积回复到步骤“1”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：将细胞悬液转移至无菌流式管，以 100μL 磁珠/1×10^8 初始单个核细胞的比例将链霉亲和素磁珠加入到单个核细胞中，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 细胞无血清培养基重悬细胞后再磁吸。

6 再次磁吸：往含磁吸细胞的无菌流式管中加入与第 5 步同体积的 Treg 细胞无血清培养基，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 10mL PBS 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 5-6x10^7 种子细胞为例）

1 第 0 天，配制 30mL Treg 细胞完全培养基：Treg 细胞无血清培养基 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），将单个核细胞按 2.0×10^6 cells/mL 的细胞密度，混悬于含有 30mL 已制备好的 Treg 细胞完全培养基中，混匀后从培养瓶包被面的对立面注入已包被并清洗完毕的 T75 瓶中，而后将 T75 瓶转移至 5%二氧化碳培养箱 37°C 培养；

1）Treg-II 化冻后反复吹打均匀后方可使用 ；

2）建议 IL-2 使用 1mL 的 Treg 细胞无血清培养基溶解后分装冻存，使用时溶解混匀即可，不可将溶解后的 IL-2 置于 2-8°C 中超过两周，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果；

3）在细胞接种后与第一次补液之前的这段时间内，尽可能不要移动培养瓶，以免使细胞扰动移位，从而中断刺激；

4）Treg 细胞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。

2 第 4-5 天，补加 Treg 细胞完全培养基 30mL：Treg 细胞无血清培养基 27mL，10%已热灭活的自体血浆（3mL）以及 500IU/mL 的 IL-2，此时培养瓶含 60mL 培养液；

注意：

1） 不同样本之间长速存在差异，第一次补液一般在第 4 天或第 5 天，若遇到细胞长势还未起来（镜下无较多集落或培养液未变色，常见于冻存样本，初始种子含量低的样本等），可延长补液时间，具体补液时间视细胞生长情况而定，后续补液时间顺延。

2）补液过程中培养瓶平取平移平放，补加培养基时从瓶口处缓慢加入。

3 第 6-7 天，将 T75 瓶中 60mL 的细胞悬液吹打均匀后转移至一个非 TC 处理的 T175 瓶中，并补加 Treg 细胞完全培养基 60mL：Treg 细胞无血清培养基 53mL，10%已热灭活的自体血浆（6mL），1mL 的 Treg-III 以及 500IU/mL 的 IL-2，此时培养瓶含 120mL 培养液；

4 第 8-9 天，将 T175 瓶中细胞悬液吹打均匀后进袋，并补加 Treg 细胞完全培养基 120mL：Treg 细胞无血清培养基 108mL，10%已热灭活的自体血浆（12mL）以及 500IU/mL 的 IL-2，此时培养袋含 240mL 培养液；

5 第 10-11 天，补加 Treg 细胞完全培养基 240mL：Treg 细胞无血清培养基 228mL，5%已热灭活的自体血浆（12mL）以及 500IU/mL 的 IL-2，此时培养袋含 480mL 培养液；

6 第 12-13 天，补加剩余 Treg 细胞无血清培养基，剩余已热灭活的自体血浆以及 500IU/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 细胞无血清培养基溶解后，可存于 2-8°C 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°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 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 细胞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。

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。

本产品仅限科学研究使用，不用于临床诊断与治疗。

【说明书核准日期】2026 年 03 月 23 日

【生产企业】

企业名称：厦门三一造血技术有限公司

生产地址：福建省厦门市海沧区生物医药产业园 B9 栋

电话号码：4001155980

邮箱地址：sales@stemery.cn

网址：http://www.stemery.cn

STEMERY