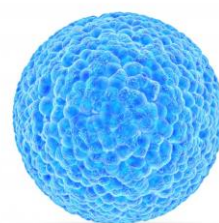


T 细胞无血清培养基（有酚红/无酚红） 操作说明书

Human T Cell Culture Medium

(ACM-T Medium)



一、产品基本信息

产品名称	Applied Cell® T 细胞无血清培养基 (有酚红/无酚红)
货号	AC-1001035/AC-1001035PRF
规格	1000mL (Without IL-2)
保存条件	2-8°C保存, 打开包装后, 2-3 周内使用完毕
保质期	12 个月

二、产品简介

T 细胞无血清培养基是埃泽思生物 (**Applied Cell®**) 是一款用于人体来源外周血来源 T 细胞扩增的无血清培养基。外周血 T 淋巴细胞的扩增培养是一项重要的免疫学研究和临床应用技术, 扩增和活化血液淋巴细胞 T 细胞可用于癌症患者的免疫治疗。**本产品无动物源成分, 未添加 IL-2 等细胞因子, 具体使用方法如下所示。**

三、材料

- 重组人白细胞介素 2/IL-2 GMP Grade(**Applied Cell®: AC-1001100**)
- 磷酸盐缓冲液 (**Applied Cell®: AC-1001037**)
- 淋巴细胞分离液 (**Applied Cell®: AC-1001030**)
- 热灭活的自体人血清或血浆, 通过离心自体血液制备。
- 细胞培养瓶
- 一次性注射器 (50mL) 。
- 生理盐水

四、操作方法(以下步骤皆应在无菌条件下操作)

4.1 包被培养瓶

- 1)向细胞培养瓶中加入 10-15mL 抗 CD3 抗体溶液(用磷酸盐缓冲液稀释至 5mg/mL)。
- 2)轻轻摇动烧瓶, 将抗体溶液涂在整个表面。
- 3)在室温下放置 1 小时或在冰箱中放置过夜
- 4)吸出并移除溶液, 然后用 10 mL 缓冲液清洗 1 次
- 5)处理过的培养瓶应立即使用或储存在冰箱中不超过一周时间。

*通过这种处理, 培养瓶的表面变成亲水性的, 并且液体容易在表面上散布。

4-2 淋巴细胞和血浆的收集

- 1)外周血淋巴细胞的制备(PBL)

使用淋巴细胞分离液通过密度离心法从 25ml 肝素化的外周血中分离外周血淋巴细胞。

- 2)用移液管收集上层血浆, 倒入灭菌试管中, 用于制备自体热灭活血浆。

3)小心地将中间白细胞层收集到离心管中，并用缓冲液稀释 3 倍以上，并用于 4-4 步骤使用。

4-3 灭活血浆制备

- 1).用移液管小心地将上层血浆收集到无菌离心管中。
- 2).在 56°C下加热 30 分钟。
- 3). 在室温下 1,200xg 离心 10 分钟。。
- 4).用移液管将上清血浆收集到无菌容器中，并储存在-20--80°C保存。

4-4, 外周血单核细胞(PBMC)制备

- 1).使用移液管将第二层的单核细胞收集到无菌离心容器中。
- 2).用缓冲液稀释 2 倍以上，在室温，500G 离心 5 分钟，沉淀细胞。
- 3).吸掉上清液；
- 4).用缓冲液洗涤细胞，并通过以 500xg 离心 5 分钟沉淀细胞。
- 5).去除上清液。

4-5 T 淋巴细胞的初始培养 (day0-day3-day5)

- 1).用含有 **700 IU/ml IL-2** 和 **10%热灭活血浆**的 **50mL ACM-T 培养基**以约 1×10^6 细胞/ml 的细胞密度重悬 PBMC。
- 2).将细胞悬浮液接种到包被好的培养瓶中(50mL/T-225 培养瓶)。
- 3).在 37°C的 5% CO₂ 培养箱中培养 3 天。
- 4).培养 3 天后，在培养瓶中加入 **50ml 含 700IU/mL IL-2 的 ACM-T Medium**，继续培养。
- 5).培养 2 天后，扩增至 3 个培养瓶，并在每个培养瓶中补充加入 **70ml ACM-T Medium(添加 700 IU/ml IL-2, 无需添加血浆)**。

4-6, 培养袋扩增培养 (day5-day8-day12)

- 1).在培养后 3 天后，将以上 3 瓶细胞悬液收集，并转移到 1 个细胞培养袋中，同时需加入额外加入 **700 -1000mLACM-T Medium (添加 175 IU/mL IL-2, 无需添加血浆)**。
- 2).在培养 4 天后,将以上细胞平均分配到 2 个培养袋中,并向每个袋中加入 **500mL ACM-T Medium (添加 175 IU/mL IL-2, 无需添加血浆)**。
- 3).根据培养计划，在相同条件下继续培养，直到达到期望的细胞数。

4-7, 细胞收获

- 1).在培养后的第 14 至 21 天，将所有细胞悬液收集到无菌离心瓶中，并以 500xg 离心 10 分钟。
- 2).用含有 0.1%白蛋白的生理盐水或缓冲液洗涤细胞 1-2 次，洗涤后 500xg 离心 10 分钟收集细胞，。
- 3).用含有 1%人血清白蛋白的注射溶液或生理盐水重新悬浮细胞，计数。

五、培养时间流程表

天数	培养瓶/细胞培养袋	培养瓶/细胞培养袋	ACM-T 培养基添加量(mL)	IL-2 单位: IU/mL	自体血浆添加量 (mL)	对应流程
Day1	T-225	1	--	--	NO	4-1
Day 0	T-225	1	50mL	700	5ml	4-2/4-3/4-4/4-5
Day 3	T-225	1	50mL	700	NO	4-5
Day 5	T-225	3	70mL x 3	700	NO	4-5
Day 8	培养袋	1	1000 mL	175	NO	4-6
Day 12	培养袋	2	1000 mL	175	NO	4-6
Day14	培养袋	2				4-7

生产企业:

上海埃泽思生物科技有限公司

地址: 上海市宝山区园丰路 69 号联东粤浦科技园 1 号楼 401 室

电话: 021-59541913

网址: www.appliedcell.cn

ISO9001 质量体系认证企业

医疗器械生产备案企业

欧盟 CE 认证企业

文件版本号:

B202210.1