

NKT SFM Kit

T 细胞无血清培养系统

使用说明书



珠海恺瑞生物科技有限公司

【技术支持】：如您遇到任何问题，请与我司技术支持人员联系， Tel:0756-3631186

NKT SFM Kit T 细胞无血清培养系统使用说明书

【产品信息】：

产品名称	产品货号	包装规格	存储条件	有效期
ACE NKT-SFM	ACE11101	500 ml/瓶	2-8°C, 避光	9 个月
ACE AC-T	ACE11102	1 ml/支	-20°C	12 个月
ITSplus	K50001	10 ml/瓶	-20°C	12 个月
重组人 IL-2 蛋白	ACE11103	0.5 ml/支	-20°C	12 个月

温馨提醒：

- (1) 产品切勿紫外照射；
- (2) 使用前无需预热处理；
- (3) 储存培养基请使用医用冰箱，切勿冷冻；
- (4) -20°C 储存低温冷冻试剂，建议用户根据需求分装冻存，避免反复冻融，开封后在 4°C 存储，ACE NKT-SFM 及 ACE AC-T 两个月内用完，重组人 IL-2 蛋白一周内用完。

【适用范围】：仅限于科研使用，不适于临床诊断和治疗。

【主要成分】：该产品为无血清培养基，不含动物源成分。

【预期用途】：可用于人外周血（PBMC）中 T 细胞的激活及体外培养等。

【运输要求】：

- (1) ACE NKT SFM：湿冰避光运输
- (2) ACE AC-T：湿冰或冷冻运输
- (3) 重组人 IL-2 蛋白：湿冰或冷冻运输
- (4) ITSplus：湿冰或冷冻运输

1. 实验准备

本实验方法为体外激活、培养人外周血（PBMC）中 T 细胞培养方法。

1.1. 培养基配制所需试剂

【技术支持】：如您遇到任何问题，请与我司技术支持人员联系，Tel:0756-3631186

- 1.1.1. ACE NKT SFM: 淋巴细胞基础无血清培养基
- 1.1.2. ITSplus (100×): 重组 IGF-1 及转铁蛋白复合试剂
- 1.1.3. 重组人 IL-2 蛋白(1000×): Fc-IL-2 融合蛋白, 用户可选用其它类型的 IL-2 蛋白
- 1.1.4. ACE AC-T (100×): T 细胞生长激活剂, 内含人源重组 CD3 及 CD28 抗体, 以包被培养器皿表面方式使用

1.2. 实验所需设备

- 1.2.1. 生物安全柜
- 1.2.2. 离心机
- 1.2.3. 倒置相差显微镜
- 1.2.4. 二氧化碳静置培养箱 (37°C, 5% CO₂)

2. T 细胞无血清培养实验步骤

2.1. 包被 T 细胞激活剂:

- 2.1.1. 培养 T 细胞前, 用 1×PBS 将 ACE AC-T 稀释至 1X 使用。
- 2.1.2. 加入细胞培养瓶或培养袋内室温孵育 2 小时或 37°C 孵育 1 小时。
- 2.1.3. 包被结束后, 使用 1× PBS 清洗培养瓶或培养袋, 洗涤三次, 除去包被液后立即使用。

2.2. T 细胞完全培养基的配制:

- 2.2.1. 使用 ACE NKT SFM, 按 1:100 比例添加 ITSplus (100×), 以 1:1000 比例添加重组人 IL-2 蛋白 (或根据需求按照不同浓度添加), 现配现用。
- 2.2.2. 轻轻水平晃动混合均匀, 备用。

2.3. 操作步骤:

- 2.3.1. 新鲜制备的 PBMC 可直接使用。使用冻存的 PBMC 时, 取出冻存管后需迅速放入 37°C 水浴中, 使其快速融化。
- 2.3.2. 在生物安全柜中将细胞悬液缓慢转移到 5-10ml 完全培养基中, 1500rpm 离心 5min。
- 2.3.3. 弃上清, 用 10mL 完全培养基重悬细胞, 计数确定细胞密度。
- 2.3.4. 用完全培养基将细胞稀释到 $0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml, 接种到激活剂包被的培养瓶或培养袋中。
- 2.3.5. 将接种细胞的培养器皿转入 CO₂ 培养箱, 37°C, 5% CO₂ 条件下培养 (接种细胞当天计为 **培养第 0 天**)。
- 2.3.6. **培养第 3 天**, 观察细胞状态。细胞结团严重时, 可将细胞轻轻吹散, 避免因结团而出现细胞接触抑制的情况。细胞较多时, 可弃去一半体积的培养液 (半量换液), 按比例补充新鲜的完全培养液及重组人 IL-2 蛋白。
- 2.3.7. **培养第 5 天**, 根据细胞密度, 必要时将细胞转移到新的培养器皿中稀释培养, 建议细胞密度调整至 $1-2 \times 10^6$ cells/ml (使用现配完全培养基), 或者根据客户需求, 按比例添加重组人 IL-2 蛋白。
- 2.3.8. **培养第 7 天**, 观察细胞, 小心地吹散结团的细胞, 按比例补充重组人 IL-2 蛋白。
- 2.3.9. **培养第 9 天**, 根据细胞密度, 必要时使用现配完全培养基 (根据客户实验需求或经验添加重组人 IL-2 蛋白) 将细胞稀释至 $0.5-1 \times 10^6$ cells/ml。
- 2.3.10. **培养第 14 天** 收集细胞, 根据实验需要, 检测细胞表型并应用。

温馨提醒:

(1) 可以从激活 72 小时后, 观察细胞形态并计数, 每 2-3 天适当补充新鲜完全培养基或添加重组人 IL-2 蛋白, 将细胞密度调整在 $0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml 范围。可根据自身实验情况选择补液、半量换液或全部换液。