

淋巴细胞无血清培养基

说明书

名 称	淋巴细胞无血清培养基
英 文	Lymphocyte serum-free medium
货 号	ZM-TS003
含 有	D-葡萄糖； L-谷氨酰胺； 酚红； HSA
类 型	悬浮细胞
规 格	500ml
保 存	2-8° C 避光保存 12 个月
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

淋巴细胞培养基，是一种无血清培养基，专门设计用于肿瘤的免疫治疗研究。产品适用于人及哺乳类动物外周血免疫细胞的培养，包括 T、DC、CIK、NK 等细胞的研究及应用。通过添加不同的细胞刺激因子，可高效快速扩增相应的免疫细胞。也可用于培养功能上存在分化的淋巴细胞系，研究信号转导途径，以及执行有成分定义要求的应用等。该培养基的应用领域有：嵌合抗原受体的淋巴细胞相关研究（CAR-T）；淋巴因子活化的杀伤细胞（LAK）的诱导和功能研究；在 LAK 细胞诱导过程中的细胞因子和抗体活性研究；功能性人巨噬细胞的长期培养、巨噬细胞活化；鼠科动物肝转移免疫疗法的研究；淋巴细胞受体研究；以及 ADCC 依赖型淋巴细胞活化研究等。

【操作说明】

准备培养基

淋巴细胞无血清培养基内含 L-谷氨酰胺（L-Glutamine）。针对不同的使用或者样本需求，培养基在使用前应加入合适的细胞因子（加入细胞因子后应立刻使用）。实验过程中使用的生理盐水均可用不含钙镁离子的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液（DPBS）代替。

培养条件

培养基：淋巴细胞无血清培养基

细胞系：人及哺乳类来源的外周血免疫细胞。

细胞类型：悬浮细胞（静态悬浮培养）

培养容器和设备：培养瓶、培养袋和 CO₂ 恒温培养箱

培养条件：36 ~ 38 °C，CO₂ 含量 4 ~ 6 % 的湿润空气，避光。

PBMC 细胞的分离

1. 将采集的外周血收集到 2 支无菌离心管中，2000rpm/min 离心 5 min，弃上清，加生理盐水至 25 mL，使沉淀细胞充分悬浮。另取 1 支离心管，加入淋巴细胞分离液 20 mL，用滴管将血细胞悬液缓慢转移至淋巴细胞分离液的表面，使二者之间形成清晰的界面；
2. 2000 rpm/min 离心 20 min 后，从管底到液面分为 4 层，依次为红细胞和粒细胞层、淋巴细胞分离液层、外周血单个核细胞层（PBMC 层）、血浆层。用吸管将 PBMC 层吸出，转移至另一支无菌离心管中；
3. 加 DPBS 至 40 mL，1500 rpm/min 离心 5 min，结束后弃上清，重复此步骤 3 次；
4. 最后一次离心结束后，弃上清，加入 40 mL 的淋巴细胞无血清培养基在推荐的培养条件下培养。

细胞培养步骤

以下过程作为免疫细胞静态培养的一般方法。

1. 在对数生长期时，进行细胞饲养和维持，使细胞达到所需数量。每当活细胞密度达 2×10^6 个/ml 时，使用新鲜的培养基，将培养物体积稀释一倍，继续培养。
2. 为了获得良好的气体交换，建议培养基深度不超过 1.2 cm（最佳深度 1 ~ 1.2 cm）。
3. 如需在生物反应器或培养袋中高密度培养，应优化条件来确定最佳的操作步骤。

T 细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞（PBMC）的分离方法，准备 PBMC 细胞，进行细胞计数；
2. 培养初期，用预热的含细胞因子（如 IL-2）的淋巴细胞无血清培养基重悬 PBMC，活细胞密度保持在大约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml，转移细胞到相应的细胞培养容器中，然后放入培养箱内培养。

注意：随后可应用各种操作激活 T 细胞，包括添加刺激的抗体或抗原呈递细胞。无论培养 T 细胞的规模大小，细胞均可被隔离、激活和扩大。

单核细胞树突状细胞（DC）培养

1. 根据外周血单个核细胞（PBMC）的分离方法，准备 PBMC 细胞；

2. 保证细胞分离后，已经放入培养箱中培养过 2 ~ 3 小时；
3. 弃掉含非贴壁细胞的培养基；
4. 用生理盐水洗涤贴壁细胞（主要是 CD14+单核细胞）三 次；
5. 添加重组人 IL-4 和重组人 GM-CSF 到淋巴细胞无血清培养基，至终浓度分别为 50 ~ 100 ng/ml 和 50ng/ml，并以此培养基培养贴壁细胞。保持细胞密度在 $1 \sim 3 \times 10^5$ 个/cm² 之间；
6. 在培养箱中连续培养 5 天。建议第 3 天左右，使用预热的已添加 IL-4 和 GM-CSF 的淋巴细胞无血清培养基换液，换液过程务必保留所有细胞。即将培养器皿中的液体转移至 15 ml 无菌的离心管中（器皿中依旧有贴壁细胞），以 $200 \times g$ ，5 ~ 10 分钟的条件离心，吸除上清，然后加入与上清等体积的预热的新的培养基重悬细胞，并再次转移入之前包含贴壁细胞的培养器皿中，继续培养；
7. 6 天之后，细胞表现出典型的树突状细胞的形态和表面标记（比如 CD1a、CD80、CD86、HLA-DR）；
8. 向淋巴细胞无血清培养基中添加 1 ng/ml 的 LPS 或者 50 ng/ml 的 TNF- α 诱导树突状细胞的成熟；
9. 当细胞达到所需数量时，即可离心收集细胞待用。

注意：DC 培养过程中，如有发黄，则换液，补加相关细胞因子。

细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK）细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞（PBMC）的分离方法，准备 PBMC 细胞，最后一次离心去上清之后，使用少量预热的含 IFN- γ （1000 U/ml）淋巴细胞无血清培养基重悬，进行细胞计数；
2. 以 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml 活细胞密度接种入上述培养基 中；
3. 放入培养箱中培养 24 小时；
4. 加入 IL-1 α （0.1 U/ml）、CD3 单抗（50 ng/ml）、重组人 IL-2（0.3 U/ml），继续培养；每 3 天加入新的预热的淋巴细胞无血清培养基，然后补加 IL-2（0.3 U/ml），保持活细胞密度在 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml；
5. 分别于第 5、7、9 天取细胞做表型分析（FCM 检测）和细胞杀伤实验（MTT 法）；
6. 当细胞达到所需剂量时，即可离心收集细胞待用。

注意: CIK 培养过程中, 如发现培养液发黄, 则换液, 换液后补加 IL-2。如发现细胞团块结为不良絮状, 则用离心管收集后静置沉降 5 min 左右, 待絮状物沉淀后, 小心将上清细胞悬液倒回培养瓶中。

DC-CIK 细胞联合培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 在最后加入淋巴细胞无血清培养基之后, 将细胞转移至 3 个无菌培养容器中, 标记 A1、A2、A3;
2. 放入培养箱中培养过 2 ~ 3 小时;
3. 取出培养的细胞, 分别将 A1、A2 和 A3 中悬浮的淋巴细胞转移至另外 3 个无菌的培养容器中, 分别记为 B1、B2、B3。其中 A 瓶参考上述 DC 细胞的培养方法第 4 ~ 8 步操作; B 瓶参考上述 CIK 细胞的培养方法第 1 ~ 4 步;
4. 第 8 天铲下 A 瓶 DC 细胞, 收集后与相应的 CIK 混合共培养。A 瓶弃去。如果总的细胞量过于庞大, 也可将 DC 和 CIK 混合后均分到 A 和 B 瓶中;
5. 共培养的 DC-CIK 于第 10 天做微生物检测;
6. 当细胞达到所需剂量时, 即可离心收集细胞待用。

自然杀伤 (NK) 细胞培养

1. 根据外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离方法, 准备 PBMC 细胞, 最后一次离心去上清之后, 使用少量预热的 NK 细胞活化及增殖因子的淋巴细胞无血清培养基重悬, 进行细胞计数, 然后以 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml 活细胞密度接种入上述培养基中;
注意: 相关因子包括 anti-CD3、IL-2、IL-4、IL-5、IL-12、IL-15、retronectin。其中, anti-CD3、IL-2、IL-4、IL-12 为必选因子, 浓度根据具体情况调整。
2. 当细胞生长到第 3 天离心换液 (1500 rpm, 5 min) 更换新鲜培养基及相关细胞因子;
3. 第 4 ~ 6 每天镜检观察计数, 根据细胞悬液颜色添加培养液, 每次添加应为总体积的三分之一左右。
4. 第 7 天计数, 当细胞量大于 6×10^7 时, 则需加入扩增试剂, 如细胞数量在 $3 \sim 6 \times 10^7$ 时, 则长至第八天在添加 NK 扩增培养试剂, 加液时使总细胞浓度保持在 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/ml。
5. 当培养液体积大于 150 ml 或细胞数量大于 1.5×10^8 时则需转移至培养袋培养;
6. 第 8 ~ 11 天每天镜检观察计数, 根据细胞悬液颜色加培养液。第 12 ~ 14 天观察

需加液时，细胞浓度需保持在 2×10^6 cells/ml；

7. 当细胞达到所需剂量时，即可离心收集细胞待用。

嵌合抗原受体 T (CAR T) 细胞培养

因为 CAR T 细胞是基因修饰的 T 细胞，细胞培养是 CAR T 细胞整体实验的一部分。本处主要介绍如何培养能够稳定表达 CAR 的 T 细胞的一般实验步骤，对于 CAR T 其它相关操作，本说明仅做普通描述：

1. 选取靶点：已知肿瘤特异抗原（或相关抗原）或者鉴定新抗原；
2. 获取 scFv：免疫小鼠，构建基因文库，筛选高亲和力 scFv；
3. 构建 CAR T 细胞：构建 CAR 表达载体，分离 T 细胞（可参考前述实验方法），转染并筛选稳定表达 CAR 的 T 细胞；
4. 稳定表达的 CAR T 培养：
 - ① 进行细胞计数；
 - ② 用预热的含细胞因子（如 IL-2）的淋巴细胞无血清培养基重悬 CAR T 细胞，活细胞密度保持在大约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml，以后转移细胞到相应的细胞培养容器中，然后放入培养箱内培；
 - ③ 每 3 天加入新的预热的淋巴细胞无血清培养基，然后补加 IL-2（0.3 U/ml），保持活细胞密度在 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml；
5. CAR T 细胞体外验证：细胞培养到所需数量时，做细胞因子表达鉴定以及裂解靶向肿瘤细胞实验；
6. 验证符合需求后，收集细胞备用。

细胞悬液的制备

离心（1500 rpm，5 min）收集细胞去上清，使用含 0.5 ~ 1 % 白蛋白的生理盐水洗涤细胞，重复 3 次；最后用少量重悬液重悬细胞，进行细胞计数，再根据需要的细胞密度补充液体到合适体积，配成细胞悬液。

【注意事项】

- 1、注意无菌操作，避免污染；
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 3、仅供科研使用。