

## 永生化的人 T 淋巴细胞

### Immortalized Human T Cells

Description: Immortalized Human T Cells were generated via lentiviral transduction of T cells isolated from a healthy donor.

Organism: Human (H.sapiens)

Tissue: Blood

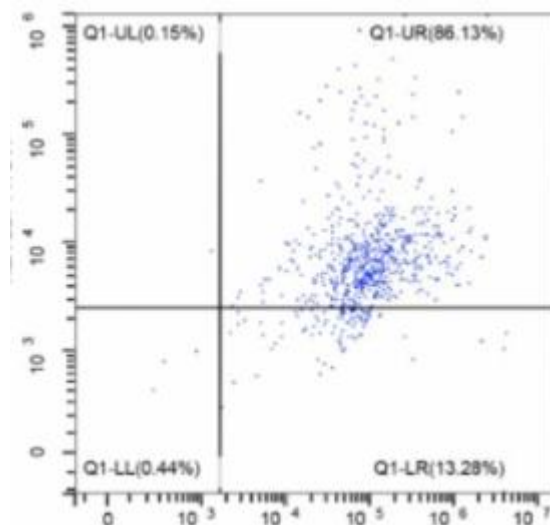
Donor Disease: Healthy

Cell Morphology: Round

Growth Properties: Suspension

Immortalization Method : Transduction with Lenti-hTERT(LV616)lentivirus,Lenti-Rb siRNA(LV621)lentivirus,and a mixture of ten lentiviruses (ID1,ID2,ID3,Nanog,EZH2,Fos,SOX2,YAP1,LMO2 and KLF4)

Selection Marker: Neomycin

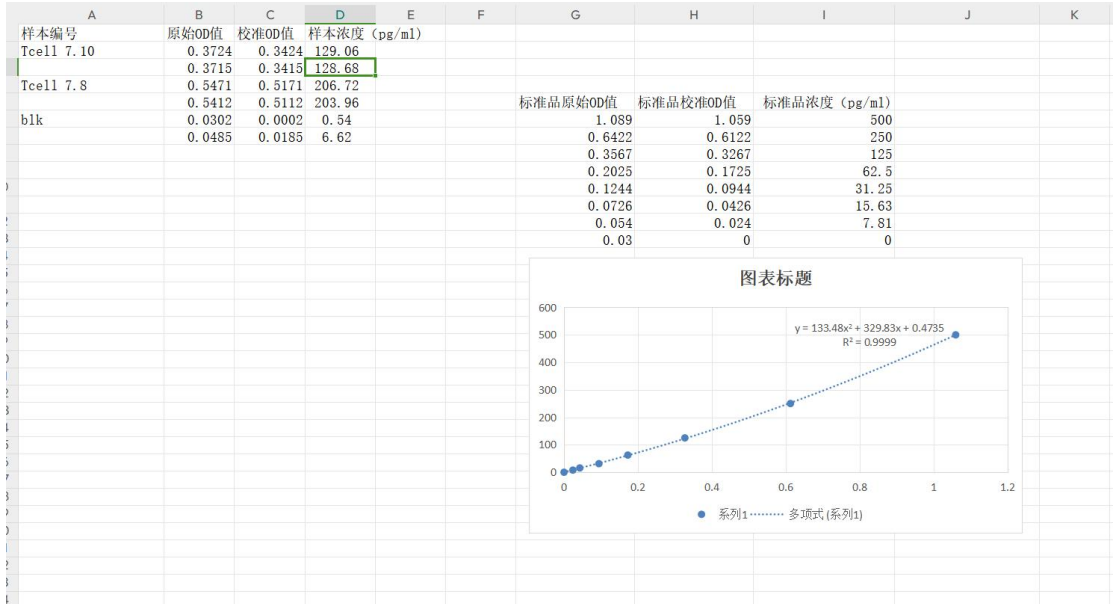
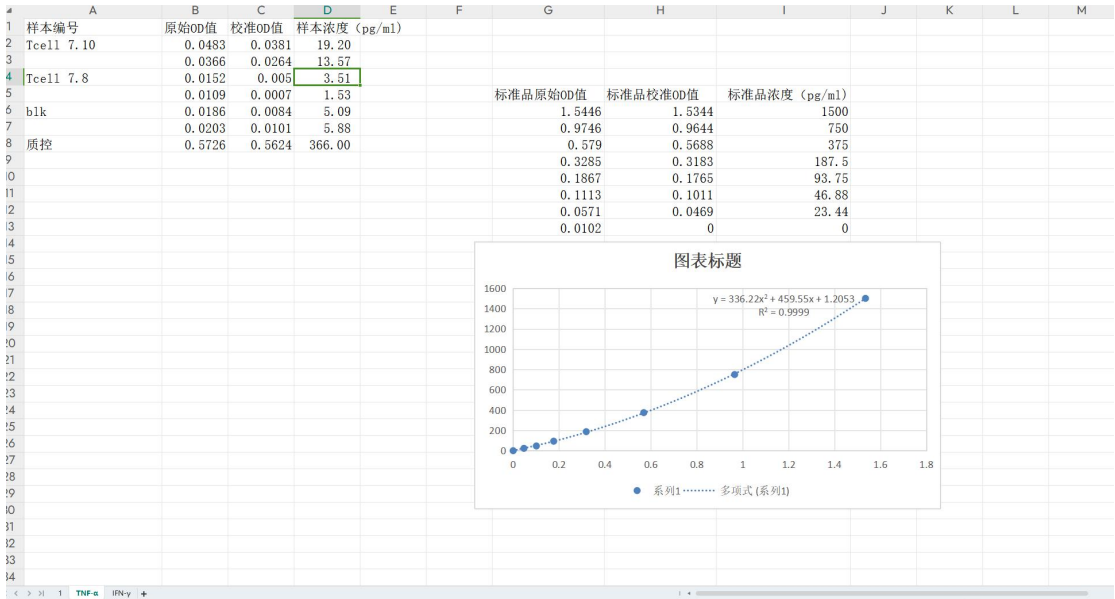


Expression Profile:

CD3 表达如上

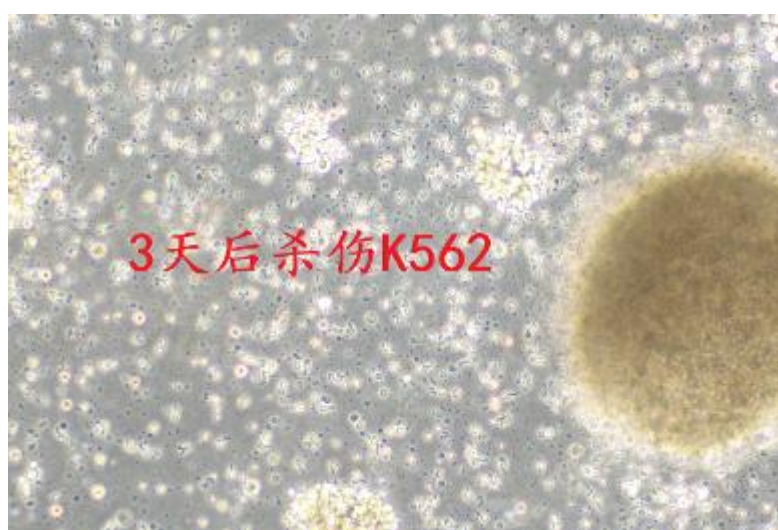
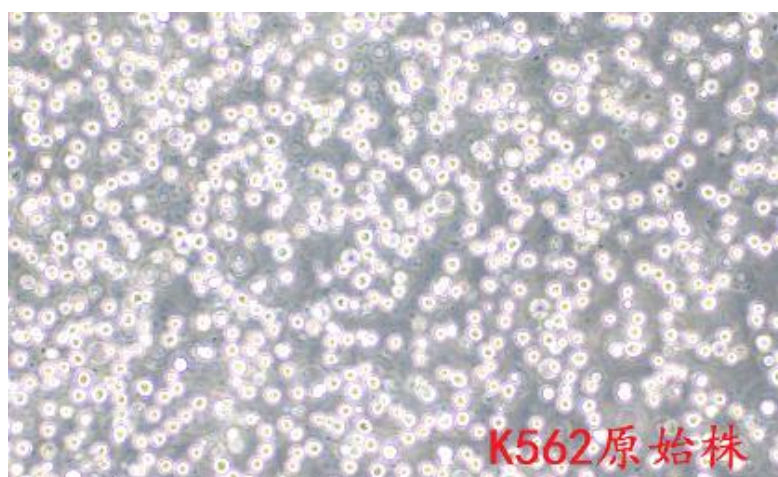
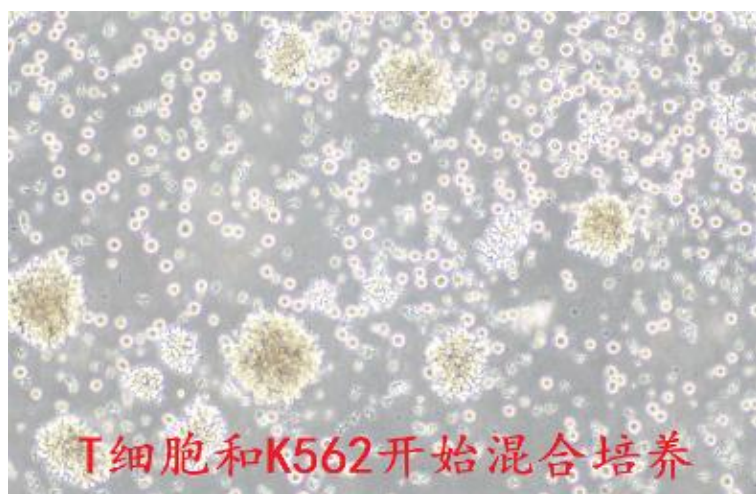
**细胞因子分泌情况:** TNF-a 和 IFN-r 其他因子分泌情况老师自己探索验证。

Blk 是对照培养基，质控的是纯的细胞因子标准品稀释液，因子的表达量是在培养两天和第四天的时候取的上清做检测。



杀伤性验证：

T 细胞和 K562 共培养 72 小时后，K562 明显被杀死。



## 运输和保存:

15ml 离心管复苏的存活细胞常温发货, 收到后按照**细胞接收后的处理**方法操作。

## 细胞接收后的处理:

1.收到细胞后, 请先检查培养瓶是否破损, 培养液是否外溢、浑浊, 并核对细胞标签信息和数量, 如果有问题及时与我们联系。

2.用 75%酒精消毒离心管, 先不要撕掉封口膜, 放置常温静置 1-2h, 待细胞恢复适应新环境后, 再进行后续操作。

3.显微镜下观察细胞状态:

a.悬浮细胞 15ml 管运输: 将 15ml 管中的细胞**轻轻**吹打均匀, **平均分为 2 份, 转移到 2 个 T25 瓶中, 每瓶补充 5ml 左右完培及 125ul 刺激剂**, 隔天观察细胞状态。**(离心管中培养基为完全培养基, 可直接使用)**

b.细胞恢复后, 按照传代流程处理。

## 培养基及培养冻存条件准备:

1) 培养基: **4\*125ml 人 T 淋巴细胞专用完全培养基( T Cell Culture Basal Medium)**。  
**使用时先将 1 管 250ul 的 IL-2 添加到 1 瓶 125ml 的 T 细胞专用培养基中, 尽量现配现用。**

2) 培养条件: 气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%。温度: 37 摄氏度, 培养箱湿度为 70%-80%。

3) 冻存液: **无血清细胞冻存液** (赠送 10ml)。

## 细胞复苏流程:

### (一)复苏前请做好准备工作:

1.提前配置好培养基, 预热水浴锅 37℃、培养基, 细胞放入干冰盒中作为中转 (注意将细胞埋起来)

2.准备一个透气 T25 方瓶, 移入 8ml 完全培养基, 做好标记。

3.准备一个 15ml 离心管, 加入 5ml 复苏专用培养基, 做好标记。

4.配置**复苏专用培养基**。这个培养基只能复苏时使用, 不能用于后续细胞培养过程中使用。**少量的 FBS 会使细胞复苏过程中恢复好一些。**

以 50ml 为例: 基础培养基取 45ml, 胎牛血清 FBS 取 5ml, 双抗 (青霉素-链霉素) 取 500ul。

5.完全培养基的使用: 基础培养基可以直接用于培养细胞, 细胞扩增需要添加补充剂每毫升添加 25ul 的量。

### 6.需要额外准备的试剂:

**1) Immunocult Human CD3/CD28 T Cell Activator**

### (二)细胞复苏步骤:

1.细胞从干冰中拿出后立即放入 37℃ 水浴锅速溶, 注意管口不能碰到水, 摇晃以加速融化, 冻存液刚好完全融化时取出冻存管擦干, 喷少量酒精消毒后移入超净工作台, 风干。



- 2.将冻存液迅速转移到有 5ml 复苏专用培养基的 15ml 离心管中混匀，1500rpm 离心 5 分钟。
- 3.弃上清后用 3ml 巴氏吸管取 3ml 完全培养基重悬细胞，这一步不宜吹打过久，**该细胞适合聚团生长，吹打次数不宜过多，上下吹打十次左右。**
- 4.细胞重悬后转移到 T25 中，摇匀后放入培养箱。
- 5.常温时 DMSO 对细胞毒性很大，细胞长时间暴露于 DMSO 中会影响复苏存活率，复苏时注意动作要快，需控制在 5 分钟内。
- 6.第二天观察细胞是否有污染，看下细胞状态，细胞在 T25 恢复状态后密度达到 80-90%以上时可以进行传代。

### (三)细胞复苏注意事项：

- 1.细胞建议复苏到 T25 中培养，T25 中培养基放 8ml 培养，细胞密度越高，恢复时间越快。**复苏时必须添加补充剂每毫升添加 25ul 的量，细胞恢复后正常观察培养。**
- 2.复苏后 24-48h 观察，细胞活性和细胞状态，一般 T 细胞刚刚解冻后需要恢复 2 周时间，需要适应新的培养基和环境。细胞恢复期间，尽量避免反复操作处理，频繁的观察。不要进行换液处理，否则细胞很难适应新的环境和条件。

## 细胞传代流程

### (一)传代前请做好准备工作：

- 1.观察细胞，确认是否可以传代，T 细胞会有些聚团生长，密度不好判断，可以对着光看液体的浑浊程度判断，澄清透明说明细胞数较少，聚团的细胞越多，液体越浑浊，培养基液体有点偏黄，再通过显微镜的视野下判断密度，就可以确认传代了。
- 2.提前将传代需要使用的 T25 方瓶准备好，预热完全培养基（完全培养基建议分装使用，每次使用前放置常温，平常放 4℃ 保存），完全培养基建议现配现用。

### (二)细胞传代方法：

- 1.取少量细胞上清标记，用于检测支原体。
- 2.悬浮细胞传代，可以**不需要离心处理**，直接将细胞稍微吹一吹，平均分配至两个新的培养瓶中，培养瓶中完全培养基体积适当多放 3-5ml。如果培养基中死细胞碎片较多，就需要收集后离心，弃上清，再重新分配。
- 3.细胞每周需要支原体检测，如果有支原体污染，细胞状态会增值缓慢，状态变差。
- 4.细胞初次培养，建议先冻存 2 支备份。

## 细胞扩增培养方案：

第 0 天：

- a. 按以下方法准备新鲜完整的 T 细胞扩增培养基：  
向 T 细胞扩增培养基中加入细胞因子——**人重组 IL-2** 充分混合。
- b. 在新鲜完整的 T 细胞扩增培养基（步骤 a 中配制）中接种活化的人 T 细胞，接种量为  $1 \times 10^6$  细胞/mL。

**第1天:** 激活 T 细胞时, 向细胞悬液中加入 25  $\mu\text{L/mL}$  的人细胞激活剂。将细胞在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  下孵育 3 天。

**第3天:** 充分混合细胞悬浮液, 进行活细胞计数。通过添加新鲜的完整 T 细胞扩增培养基将细胞悬浮液体积扩大 8 倍 (调整活细胞密度至约  $1.0\text{-}2.5 \times 10^5$  细胞/ $\text{mL}$ )。在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2 天。

**第5天:** 充分混合细胞悬液, 进行活细胞计数。至少将体积扩大 4 倍 (将活细胞密度调整至约 1.0 至  $3.0 \times 10^5$  细胞/ $\text{mL}$ ) , 向其中加入新鲜的完全 T 细胞扩增培养基。在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2 天。

**第7天:** 充分混合细胞悬液, 进行活细胞计数。至少将体积扩大 4 倍 (将活细胞密度调整至约 1.0 至  $6.0 \times 10^5$  细胞/ $\text{mL}$ ) , 向其中加入新鲜的完全 T 细胞扩增培养基。在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 3 天。

**第10天:** 如果达到了所需的细胞数量, 即可收获细胞。

**可选步骤:** 通过添加新鲜的完全培养基 T 细胞扩增培养基进行活细胞计数, 并保持细胞密度在  $0.5\text{-}1.0 \times 10^6$  细胞/ $\text{mL}$  之间。在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养 2 天后, 即可收获细胞。

## 对于人 T 细胞的长期扩增 (> 12 天):

a. 在新鲜的完全 T 细胞扩增培养基中以  $1 \times 10^6$  个细胞/ $\text{mL}$  的浓度收获并重悬扩增的 T 细胞。

b. 通过添加 25  $\mu\text{L/mL}$  的细胞激活剂进行再刺激。

c. 在 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  孵育。每 2-3 天通过添加新鲜的完全 T 细胞扩增来调整细胞密度。

**注:** 确保每 2-3 天添加一次新鲜的完全培养基; 培养基添加之间的间隔不要超过 3 天。

## (三)细胞传代注意事项:

1. 传代不建议将细胞密度放置过低, 密度过低会导致细胞需要较长时间才能长起来, 甚至长不起来, 细胞是不需要进行换液处理的。细胞密度过低时, 等待恢复, 每 3-5 天补充 1-2ml 完全培养基增加营养。

2. 培养的 T 细胞一旦恢复后增长速度会增加, 细胞会聚团生长, 并且传代时需要新旧培养基掺半培养, 新的培养基体积要大于旧的培养基, 否则营养不够, 细胞数增加时, 补充剂需要额外增加补充。

## 细胞冻存流程

### (一)冻存前请做好准备工作:

1. 确认细胞密度达到 90% 左右, 细胞状态健康, 没有支原体和细菌污染。

2. 提前取出细胞冻存液、准备好冻存管和标签标记。

3. 每支细胞冻存, 细胞数最好达到 300 万个细胞数。因为细胞在解冻时的密度不可低于  $2 \times 10^5/\text{ml}$ , 在做冻存时细胞密度应不低于 90%,  $1 \times \text{T25}$  建议冻存 1-2 支。

### (二)细胞冻存步骤:

1. 取出要冻存的细胞, 收集细胞上清悬液, 如有贴壁或成团细胞, 可以用吸管轻吹至脱落, 收集后的细胞, 进行离心 1500rpm, 5 分钟。

- 2.弃上清，根据细胞数冻存几支的量，取冻存液进行重悬细胞，不宜吹打太久，大概 10 下左右，分装成每支 1ml，分装完成后，留一些残余在离心管壁中的细胞，加入 1ml 完全培养基重悬放入 24 孔板中做无菌验证。
- 3.分装完成的细胞，立即放入程序降温盒（冻存盒），转入-80℃冰箱过夜，第二天转入到液氮中保存。

### 细胞培养过程中注意事项

1. **T 细胞激活剂**，这个成份对 T 细胞生长有关键作用。
- 2.细胞培养基不要过少，长时间放置会导致培养基会有挥发，悬浮细胞培养在方瓶中，需要足够的培养基，体积不要也不能过多，否则细胞呼吸困难，建议按照推荐的体积培养。
- 3.建议**每周或定期检测支原体**，如果有支原体污染细胞状态会越来越差。
- 4.细胞密度过高时会有很多细胞聚团在一起，可以肉眼可见的观察到细胞培养基中很浑浊的白色团块。
- 5.细胞**离心处理会损失一些细胞**，直接完全更换新鲜的培养基会导致细胞一下子适应不了。
- 6.细胞**有死细胞碎片也很正常**，活细胞比较健康就不需要额外进行处理，活细胞恢复长起来后，经过传代处理死细胞就不会有了。