

永生化人 T 淋巴细胞

描述：永生化人 T 细胞细胞系是通过慢病毒转染从健康供体分离的 T 细胞而生成的。

物种：人类

组织：血液

供体健康状况：健康

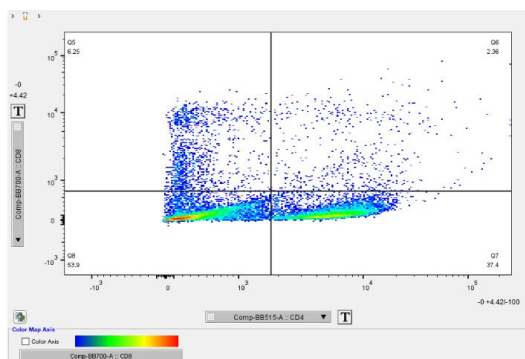
细胞形态：圆形

生长特性：悬浮生长

永生化方法：采用 Lenti-hTERT（LV616）混合慢病毒进行转染。

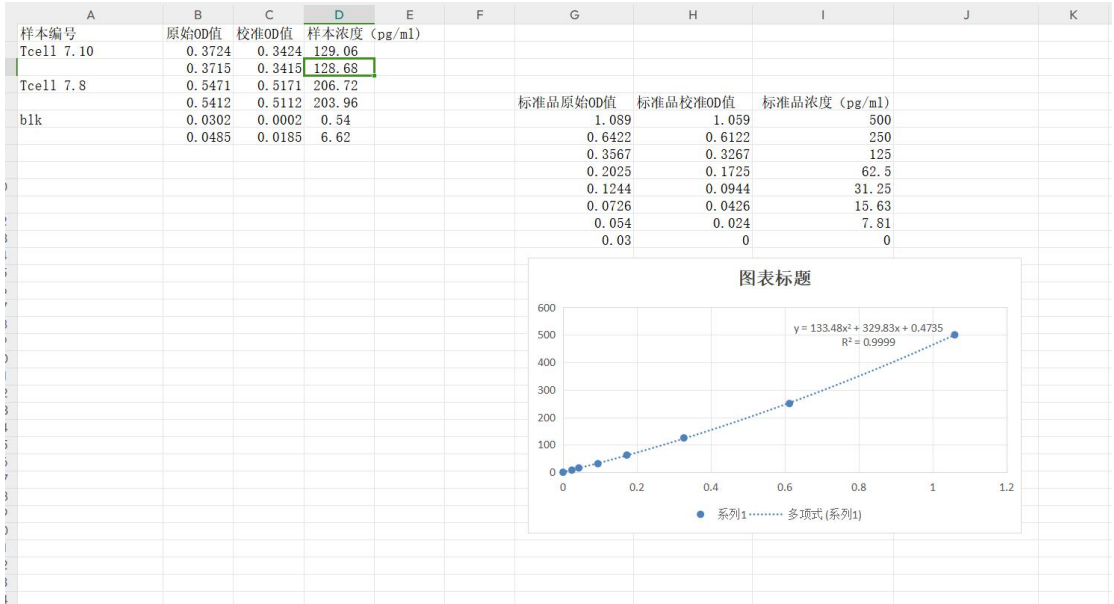
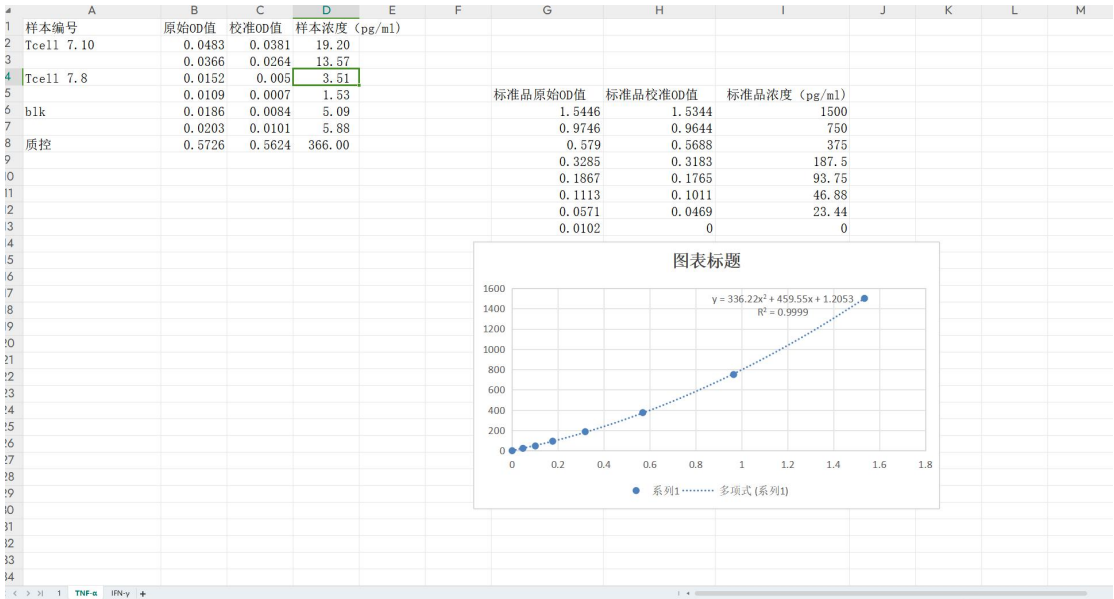
筛选标记：新霉素

表达谱：CD4 和 CD8 的表达情况见附件。



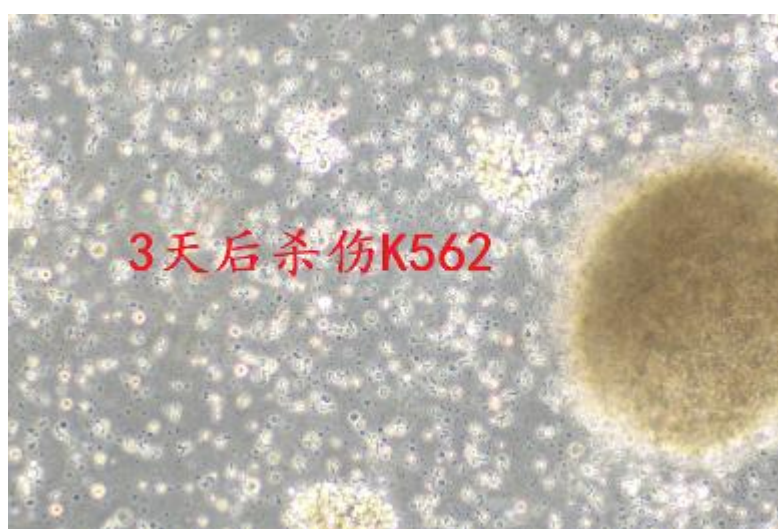
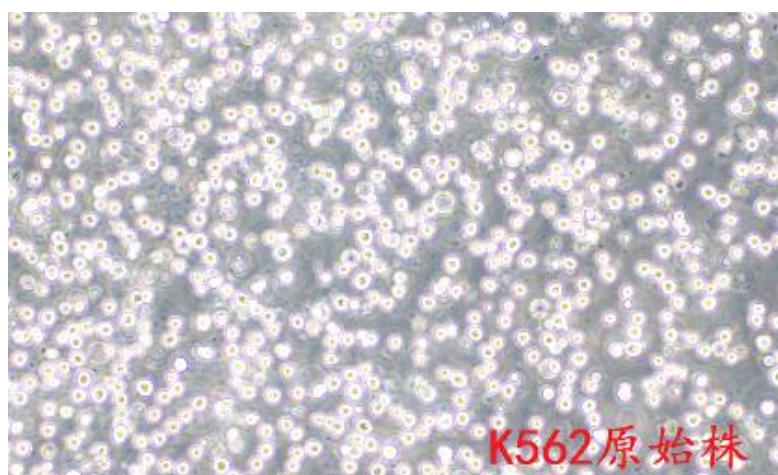
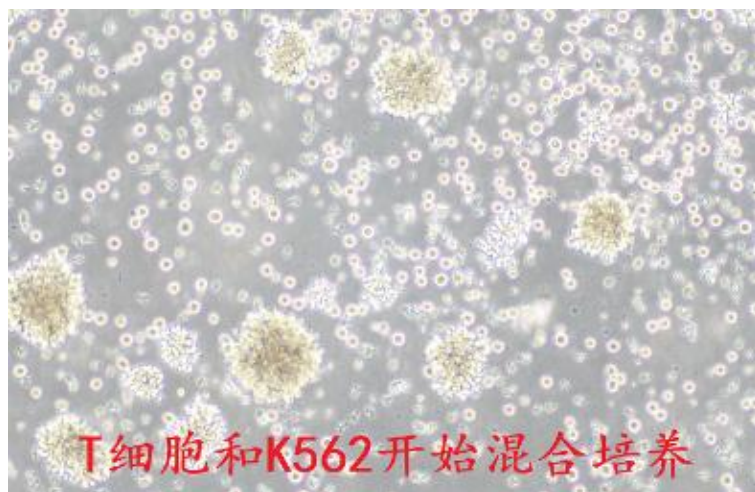
细胞因子分泌情况：TNF-a 和 IFN-r 其他因子分泌情况老师自己探索验证。

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 1×10^6 细胞/mL。

第 1 天：激活 T 细胞时，向细胞悬液中加入 25 μ L/mL 的人细胞激活剂。将细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 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 $1.0-2.5 \times 10^5$ 细胞/mL）。在 37°C 和 5% CO_2 条件下培养 2 天。

第5天：充分混合细胞悬浮液，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 3.0×10^5 细胞/mL），向其中加入新鲜的完全 T 细胞扩增培养基。在 37°C 和 5% CO_2 条件下培养 2 天。

第7天：充分混合细胞悬浮液，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 6.0×10^5 细胞/mL），向其中加入新鲜的完全 T 细胞扩增培养基。在 37°C 和 5% 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 $0.5-1.0 \times 10^6$ 细胞/mL 之间。在 37°C 和 5% 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 1×10^6 个细胞/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% 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。