

CD8⁺T 细胞的诱导和扩增

一、 实验材料描述

1. 主要试剂

试剂名称	试剂来源	货号
人外周血淋巴细胞分离液	天津灏洋	LTS1077-1
人全血单个核细胞分离液	天津灏洋	LTS10771
清洗液	天津灏洋	2010X1118
rhIL-2	同立海源	GMP-TL906
IFN- γ	近岸蛋白	GMP-CI57
581 培养基	Takara	GM-CSF
CD4 PE	Biolegend	317408
CD8 FITC	Biolegend	301006
CD8 ⁺ T 分选磁珠	美天旎	130-045-201
MS 分选柱	美天旎	130-042-201
Multi Stand 磁力架	美天旎	130-042-303

2. 主要仪器及耗材

试剂名称	试剂来源	货号
采血管	天津灏洋	TBDTM-0001
T25 培养瓶	无锡耐思生物	707001
T75 培养瓶	无锡耐思生物	708001
T175 培养瓶	无锡耐思生物	709001
NovoCyteTM Flow Cytometer	ACEA	1300

二、实验步骤

1. 特异性 CD8⁺T 细胞的诱导和扩增

1.1 CD8⁺T 细胞分离

- (1) 抽取健康供者外周血 10 mL，将血标本缓慢加入两个盛有 5 mL 外周血淋巴细胞分离液的 15 mL 无菌离心管中，保持界面清晰。
- (2) 400g，30-40 min。
- (3) 离心后，此时离心管中由上至下分为四层。第一层为血浆层。第二层为环状乳白色淋巴细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
- (4) 取白环层，加入 3 倍体积的清洗液混匀，60-100 g，离心 10 min，
- (5) 弃上清。加 6-8 mL 清洗液混匀，60-100 g，离心 10 min，弃去上清后以 0.2 mL 培养基重悬细胞后移入 0.5 mL EP 管。
- (6) 取 20 μ L CD8⁺T 细胞分选磁珠，加入细胞悬液，混匀。4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，每 5 min 轻轻弹一次。
- (7) 过 MS 分选柱: 将 MS 柱放入 Vario MACS 分选系统的磁场; 加 500 μ L buffer 冲洗 MS 柱; 待 buffer 完全过柱后，加入细胞悬液，收集流出液——未标记细胞; 待细胞完全过柱后，加 buffer 洗 MS 柱 (3 \times 1 mL)，最后用配套的活塞推出 CD8⁺T 细胞于 0.5 mL EP 管中。

1.2 CD8⁺T 扩增培养

GT-T505 培养基加入 20 μ g/mL IFN- γ 、1000 U/mL IL-2 和 5% FBS，作为 CD8⁺T 细胞完全培养基。将 CD8⁺T 细胞移入 T25 培养瓶，密度为 5 \times 10⁵/mL。当细胞密度超过 1 \times 10⁶ 后进行等量补液。培养体积扩大后依次转入 T75 和 T175 进行扩增。

三、实验结果

2. CD8⁺T 细胞鉴定

