Version 2，2026

CulLymγδT-KIT01 使用说明书

【产品类型】：γδT 细胞无血清培养试剂盒

【产品名称】：CulLymγδT-KIT01

【产品货号】：CM-γδTKIT01



【包装规格】：

试剂盒组分	型号	货号/规格	保存条件
γδT 细胞无血清培养基	MCM CulLymγδT-SFM40	CM040-1000/1000mL×2	2～8℃
激活因子-1	γδTMKIT01-01	γδT-AF01 /0.5mL×1	-20℃
激活因子-2	γδTMKIT01-02	γδT-AF02 /0.5mL×1	-20℃
激活因子-3	γδTMKIT01-03	γδT-AF03 /1.0mL×1	2～8℃
扩增因子	γδTMKIT01-04	γδT-EF /1.5mL×1	-20℃

【主要成分】：该产品为无血清培养基，不含动物源性成分。主要含糖类、氨基酸、无机盐、转铁蛋白、微量元素等。

【预期用途】：本品适用于人γδT 细胞体外高效扩增培养（适用于以肝素、枸橼酸钠等为抗凝剂的样本，也适用于冻存样本）。

【性能指标】：

无菌检测：阴性（细菌、真菌、支原体）	内毒素：<1EU/mL
pH：7.0～7.3（室温）	渗透压：280～350 mOsm/kg
外观：红色，澄清液体	

【运送要求】：

上海东富龙生物试剂有限公司 上海市闵行区都会路 139 号 http://bitec.tofflon.com 电话：+86 21-64909996-393 传真：+86 21-64909996-730

2～8℃，避光运送；

【储存条件及有效期】：

避光存储(存储温度参见【包装规格】)；有效期 12 个月。

【使用方法】：为获得最佳细胞培养扩增效果，请参考以下操作：

I. 准备作业

1. γδT 细胞扩增完全培养基配制

1.1. 照每 1000mLγδT 细胞无血清培养基，加入 750uL 扩增因子（γδTMKIT01-04）配制γδT 细胞扩增完全培养基。

1.2. 混合均匀，2~8℃避光保存备用。有效期两周，于保质期内使用。

注：因子勿反复冻融，可按需分装。

II. 作业流程

Day 0，第 0 天

1. 样本血浆分离及灭活

1.1.开启水浴锅，温度设置为 56℃。

1.2.供者外周血 50mL（其中 10mL 用于血常规和传染病检测），将采集的血样转入 50mL 离心管。

1.3.700g 离心 10min（快升慢降）。

1.4.用移液器吸取上层淡黄色血浆于一个新的 50mL 离心管并标识。

1.5.将标识好的离心管用封口膜封口，放入 56℃水浴锅中，热灭活 30min.

1.6.灭活后即刻转入冷藏室（或碎冰）中冰浴 15～30min，2000g 离心 10min，吸取上清于新的离心管。

2. PBMC 分离

2.1.用移液管将下层的血细胞与 DPBS（或其它平衡盐溶液）1:1 混匀，按 2:1（血细胞悬液：Ficoll）将血细胞悬液沿离心管管壁缓慢加入装有 Ficoll 的离心管内。

注：轻柔操作，勿打破 Ficoll 分界面。

2.2.将离心机升降速调至最低，500g 离心 30min。

2.3.离心结束后，用移液管吸取中间白膜层置于新的 50 mL 离心管，加入 40 mL DPBS（或其它平衡盐溶液）混匀，500g 离心 10min，洗涤两次，以去除血小板等杂质。最后一遍洗涤可选择使用γδT 细胞

无血清扩增培养基，可提高细胞活率。

3. 特异性激活

3.1. 将γδT 细胞扩增完全培养基预热至 37℃备用。

3.2. 将洗涤好的细胞悬液用 5mLγδT 细胞扩增完全培养基重悬，取样计数。根据细胞计数结果，补加γδT 细胞扩增完全培养基，接种密度控制为 1.5~2.5×10^6/mL，按照培养基总体积添加激活因子-1（γδTMKIT01-01，总体积：激活因子 1=1mL：25uL）、激活因子-2（γδTMKIT01-02，总体积：激活因子 2=1mL：25uL）和激活因子-3（γδTMKIT01-02，总体积：激活因子 3=1mL：30uL）以及添加终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

注：前 3 天细胞处于激活的关键时期，应避免晃动细胞，尽量减少观察。因子勿反复冻融，可按需分装。

Day 3，第 3 天

1. 将γδT 细胞扩增完全培养基预热至 37℃备用。

2. 取出培养的γδT 细胞，根据细胞生长状态添加 1 倍体积的γδT 细胞扩增完全培养基，或者取样计数后接种密度控制为 0.8×10^6/mL，添加终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

注：若出现较大的细胞团，可以轻拍培养瓶或在补液时进行吹打，注意吹打的力度避免将细胞团吹成单个细胞。补液后的密度不可低于 0.6×10^6/mL。

Day 5，第 5 天

1. 将γδT 细胞扩增完全培养基预热至 37℃备用。

2. 取出培养的γδT 细胞，显微镜观察及取样计数，补加γδT 细胞扩增完全培养基，接种密度控制为 0.8×10^6/mL，添加终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

注：4~9 天处于γδT 细胞快速增长期，可以每天取出细胞进行观察，若培养基颜色明显发黄，可以添加 0.5 倍体积的γδT 细胞扩增完全培养基，以及终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

Day 7 ~ D14/21

1. 将γδT 细胞扩增完全培养基预热至 37℃备用。

2. 取出培养的γδT 细胞，显微镜观察及取样计数，补加γδT 细胞扩增完全培养基，接种密度控制为 0.8×10^6/mL，添加终浓度 5%-2%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

3. 之后每隔一天，取出培养的γδT 细胞，显微镜观察及取样计数，按照 0.8×10^6/mL 密度添加γδT 细胞扩增完全培养基继续培养。

上海东富龙生物试剂有限公司 上海市闵行区都会路 139 号 http://bitec.tofflon.com 电话：+86 21-64909996-393 传真：+86 21-64909996-730

注：如细胞扩增缓慢可根据需要添加不超过5%已灭活的自体血浆（或商业化人AB血清或商业化血清替代物）。

4. 培养至 D14，细胞总量一般能到达 2×10^9 以上，最长培养时间为 21 天，当细胞量到达需求量时，离心收获细胞，经检测合格后，按需求使用。

注：

① 细胞培养第 14 天，一般 CD3+TCR γ/δ+ >80%，扩增倍数>100 倍。

细胞培养第 21 天，一般 CD3+TCR γ/δ+ >85%，扩增倍数>500 倍。

② 由于不同样本存在差异，扩增及纯度情况存在差异，且部分样品培养 14 天以上会提前出现细胞老化及凋亡现象，建议根据实际情况选择培养时间，收获细胞。

注：参考质量检测

检测项目	检测内容
无菌检测	最终品取样，检测细菌、真菌、支原体，均应呈阴性
内毒素检测	最终品取样，内毒素（<1EU/mL）
细胞存活率检测	最终品取样，活率>90%
表型分析	CD3、TCR γ/δ+（CD3+TCR γ/δ+ >80%，TCR γ/δ+>85%）
细胞杀伤	检测效应细胞对肿瘤靶细胞的杀伤率

注：

①参考补液程序

由于样本存在差异，作业流程供参考，在培养过程中需根据培养情况进行适当调整。

时间	培养耗材	培养基	补液体积（mL）	总体积（mL）	血清替代物比例	血清替代物量（mL）
D0	T75	激活培养基	20（接种）	20	10%	2
D3	T75	扩增培养基	20	40	10%	2
D4	T75、T175	扩增培养基	20	60	10%	2
D5	T75、T175	扩增培养基	60	120	10%	6
D6	4*T175	扩增培养基	60	180	5%	3
D7	4*T175	扩增培养基	180	360	5%	9

D9	培养袋/反应器	扩增培养基	360	720	5%	18
D10	培养袋/反应器	扩增培养基	280	1000	2%	5.6
D11	培养袋/反应器	扩增培养基	500	1500	2%	10
D12	培养袋/反应器	扩增培养基	500	2000	2%	10
D14-D16	培养袋/反应器	\	收获	\	\	\

【注意事项】：

1. 本产品仅供进一步制造或研究使用。不适用于人或动物的诊断和治疗用途。
2. 产品启封后应立即使用或分装保存，否则产品性能将受影响。培养基预热时，用多少取多少，禁止将整瓶培养基预温、禁止反复预温。
3. 使用前应进行细胞培养测试，确认性能后再使用。
4. 使用后产生的废弃物处理，应遵守使用者所在地相关法律法规要求，不得随意丢弃。

【说明书核准及修改日期】：2026 年 04 月

【技术支持】：

根据销售条款，如您遇任何问题，请与我公司技术人员联系：

Tel：+86 21-64909996-393 Fax：+86 21-64909996-730

Email：bioreagent@tofflon.com

附. 冻存PBMC的复苏操作

1. 材料

细胞培养基、水浴锅、15 mL无菌离心管；移液枪；15mL移液管；25mL移液管；自动移液器和无菌枪尖；室温离心机。

2. 步骤

2.1 预热细胞培养基。

2.2 迅速将细胞冻存管转移到37°C的水浴中（注意冻存管帽不可接触液面，否则易造成污染），解冻细胞，直到只剩下一个小冰晶（复苏时间控制在1~2min）。

注：若细胞储存在液氮罐内，建议从液氮罐取出冻存管，将其放在超低温冰箱（-80 ℃）或干冰中3 ~ 5min，用来释放冻存管内残留液氮压力。

2.3 缓慢加入0.5 ~ 1 mL细胞培养基到冻存管中，重悬细胞并将其从冻存管转移到15mL离心管中。用1mL细胞培养基冲洗冻存管，并将其转移到15mL离心管中。用细胞培养基补充至10mL。

2.4 400 × g离心10分钟。

2.5 丢弃上清，将细胞重悬于1mL细胞培养基中。

2.6 计数细胞并测定细胞存活率。