

巨噬细胞培养试剂盒说明书

【产品名称】巨噬细胞培养试剂盒

【产品货号】MCF-006

【包装规格】1 支试剂 A (1mL/支)、1 支试剂 B (0.3mL/支)、1 支试剂 C (0.5mL/支)、1 支试剂 D (0.5mL/支)。

【预期用途】

本巨噬细胞培养试剂盒用于从 10mL 人外周血中诱导培养出 M2 亚型巨噬细胞, 经 8 天培养, 收获约 $1\sim 2\times 10^6$ 个细胞, $CD11b^+CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞比例 $\geq 60\%$, 单一标志物指标 $\geq 70\%$, 细胞活性 $> 90\%$ 。

【储存条件及有效期】

试剂盒储存于 -20°C (长时间储存请置于 -80°C)。

有效期 12 个月。

【样本要求】

本试剂盒要求无菌条件下获取的新鲜肝素钠抗凝人外周血分离获得的单个核细胞, 且血常规检测中淋巴细胞数量在正常范围内, 血液收集时应无菌操作且处理和运输过程中避免冷冻。

【使用方法】

1. 准备工作

除了该试剂盒以外, 需要额外准备淋巴细胞分离液, RPMI 1640 培养基, 庆大霉素(4 万 IU/mL)或青霉素链霉素溶液(100 \times), Trypsin 或 TrypLE 胰酶, Nuclon™ Delta 处理的 T75 细胞培养瓶;

试剂 A、试剂 B、试剂 C、试剂 D 使用当天需要提前从冰箱中取出, 恢复至室温。

(注 1: 试剂 B 解冻后有结晶沉淀析出是正常现象, 充分混合均匀即可恢复澄清)

(注 2: 可根据需要添加庆大霉素或青霉素-链霉素等抗生素以防止污染)

2. 淋巴细胞分离

2-1. 提前 30min 将淋巴细胞分离液从 4°C 冰箱中取出置于室温, 待温度升至室温后使用。

2-2. 将抗凝血以 700g 离心 20min (降速最慢), 收集上层血浆, 56°C 灭活 30min, 然后 4°C 放置 15min, 最后 2000g 离心 15min 后吸取上层血浆 4°C 保存备用, 即为热灭活血浆。

2-3. 除去血浆后的下层血液加入 DPBS 至原血液体积, 混匀, 沿管壁缓慢加至与血液等量的淋巴细胞分离液上, 注意保持清楚的界面, 以 800g 离心 15min (缓升缓降) 离心管中由上至下分为四层。第一层为 DPBS 层, 第二层为环状乳白色淋巴细胞, 第三层为分离液层, 第四层为红细胞层。

2-4. 收集第二层环状乳白色淋巴细胞加入到一个 50mL 离心管中, 补加 RPMI 1640

(或 DPBS、生理盐水)至 50mL, 600g 离心 10min, 弃上清液, 再用 50mL RPMI 1640 (或 DPBS、生理盐水) 重悬细胞, 此步骤取样进行细胞计数, 500g 离心 10min, 弃上清液。

3. 淋巴细胞吸附

3-1. 向 8mL RPMI 1640 培养基中加入试剂 A 与 1mL 热灭活血浆, 配制成 10mL 培养液。

3-2. 使用培养液将 2. 中获得的淋巴细胞重悬成密度 $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 接种于一个 Nuclon™ Delta 处理的 T75 细胞培养瓶中。(一般情况下, 10mL 外周血分离出的淋巴细胞可使用 10mL 培养液重悬。)

3-3. 将接种好淋巴细胞的 T75 细胞培养瓶, 放置于恒温培养箱 (37°C、5.0% CO₂、饱和湿度) 中培养 24 小时。

4. 巨噬细胞完全培养基的配制

向 27mL RPMI 1640 培养基中加入 3mL 热灭活血浆、一支试剂 B、一支试剂 C 和一支试剂 D、30μL (4 万 IU/mL) 庆大霉素, 配制成 30mL 巨噬细胞完全培养基, 置于 2~8°C 保存。使用前需提前从冰箱取出, 待液体温度升至室温后使用。

5. 巨噬细胞培养

5-1. 细胞静置培养超过 24h 后, 弃去培养上清液, 使用 5mL/次的 RPMI 1640 (或 DPBS、生理盐水) 润洗细胞培养瓶两次, 去除未贴壁细胞。

5-2. 向 T75 瓶中加入 10mL 巨噬细胞完全培养基, 将 T75 瓶放回培养箱, 继续培养。

5-3. 第 3 天, 弃去 T75 瓶中的培养上清液, 补充 10mL 巨噬细胞完全培养基。

5-4. 第 6 天, 弃去 T75 瓶中的培养上清液, 补充 10mL 巨噬细胞完全培养基, 同时取样做无菌、支原体、内毒素检测。

6. 巨噬细胞收获

第 8 天, 收集 T75 瓶中的培养上清液 (离心去除细胞后可作为消化终止液使用), 用 5mL/次的 DPBS (或生理盐水) 润洗两次;

加入 5mL Trypsin 或 TryPLE 胰酶, 室温消化 3 分钟, 用 0.5mL 热灭活血清或 5mL 消化终止液终止消化, 使用移液枪轻柔吹打下瓶底的贴壁细胞。

收集 T75 瓶中的所有细胞, 加入生理盐水, 2000rpm 离心 8min 洗涤细胞两次, 并进行细胞计数。使用生理盐水重悬细胞, 转入注射器或输液袋, 制成终制品, 封装。

【产品性能指标】

1. 外观: 试剂盒标签、各组分标签清晰, 易识别, 各试剂小管置于产品内包装中, 各组分齐全, 液体无渗漏。
2. 细菌内毒素: $< 0.5\text{EU}/\text{mL}$ 。
3. 无菌: 无细菌检出。
4. 支原体: 无支原体检出。
5. 细胞生长测试: 经 8 天培养, CD11b⁺巨噬细胞比例 $\geq 80\%$, CD68⁺巨噬细胞比例 $\geq 60\%$, CD206⁺M2 亚型巨噬细胞占巨噬细胞比例 $\geq 90\%$, 细胞活性 $> 90\%$ 。

【注意事项】

1. 各试剂应置于规定储存条件保存，避免微生物的污染。
2. 使用前，试剂盒试剂从-20°C或-80°C条件下取出，置于2~8°C条件下缓慢解冻。
3. 使用前，试剂盒试剂需瞬时离心。
4. 不同批次试剂盒中各组分不可互换使用。
5. 严禁使用过期产品。

【参考文献】

[1] Nielsen MC, Andersen MN, Møller HJ. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology*. 2020 Jan;159(1):63-74.

[2] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaceli SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6425-6440.

【基础信息】

生产企业名称：深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司

生产地址：深圳市龙华新区龙华街道清祥路清湖工业园宝能科技园6栋A座15楼ABCDEF单位

联系方式：0755-86548612

网址：<http://www.morecell.com.cn/>



默赛尔
BIOMEDICAL