

NKT 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

NKT Cell Robust Expansion Kit

(货号: 665070)

1. 产品介绍

- 1.1 本产品是一款 NKT 细胞高效扩增的试剂盒。外周血/脐带血中的 PBMC 细胞经本试剂盒处理后，在 14-16 天时间内，细胞总数可达到 6×10^9 - 8×10^{10} ，细胞存活率 90%以上，扩增倍数在 500-1000 倍，NKT 细胞比例最高可达 60%以上。
- 1.2 本试剂盒适用于人外周血/脐带血和经过血细胞单采仪处理获得的白细胞等来源的样品。
- 1.3 本试剂盒是在符合相关规范的无菌环境中生产，并已通过了严格的细菌、真菌、支原体、病毒(HIV、HAV、HBV、HCV)、内毒素检测。本试剂盒不含血浆、动物源成分以及其它不明确成份。

2. 材料和设备

2.1 试剂盒套装组成

套装内容	数量	单位	保存条件	产品性状
NKT Cell Culture Medium (665071)	2	瓶	2-8℃	液体
NKT-A (665072)	1	支	-20℃	液体
NKT-B (665073)	1	支	-20℃	液体
NKT-C (665074)	1	支	-20℃	液体
NKT-D (665075)	1	支	-20℃	液体
NKT-E (665076)	2	支	-20℃	冻干粉

2.2 用户需要自行准备的试剂耗材

0.4% 萘酚蓝溶液、生理盐水、人淋巴细胞分离液、肝素钠（或锂）采血管或 100ML 采血袋、PBS、75cm² 悬浮培养瓶、175cm² 培养瓶、细胞培养袋、15mL/50mL/250mL 离心管、移液管、5mL 和 50mL

无菌注射器等。

3. 样本采集及运输要求

3.1 外周血样本采集应为肝素钠采血管，脐带血优先选择 100ml 采血袋，采集过程应严格规范无菌。

实际采血总量应大于 50ml，采集后血液与抗凝剂应及时混匀。

3.2 样本运输条件为 18-25℃，24 小时内处理样本。

4. PBMC 的分离和血浆制备（以 50ml 样本 THERMO ST16 离心机为例）

3.3 将 50ml 血液样本均分至 2 个 50ml 离心管，3000rpm，10min，取上层血浆转移至新的离心管，56℃，30min 灭活，4℃ 静置 10min，3000rpm，10min，用吸管将上清液转移至新的离心管中，-20℃ 保存，使用前取出；

3.4 剩下细胞加入生理盐水至原体积，充分混合均匀，转移至 2 个装有 15ml 淋巴细胞分离液的 50ml 离心管中，室温下 1800rpm，30min；

3.5 取出 PBMC 至新的 50ml 离心管；加入生理盐水至 45ml，1600rpm，8min；

3.6 去上清，加入生理盐水至 45ml，充分混匀，取样计数；

3.7 1400rpm，10min 收集 PBMC。

5. 培养基使用说明：

每瓶培养基 {NKT Cell Culture Medium™ (665071)} 加入一支 NK-E (665076)，混匀，使用前恢复至室温。

6. 细胞接种

6.1 取 45ml 已配置培养基加入 NKT-A(665072) 和 NKT-B(665073) 以及 5ml 自体血浆混匀待用；

6.2 用混匀后的培养基重悬已经收集好的单个核细胞；细胞密度应大于 1.5×10^6 cell/ml；

6.3 转移混匀后的细胞悬液至 75cm² 悬浮培养瓶，再缓慢平放于培养箱中培养。

7. 补液

6.4 D3，镜下观察有较多克隆团出现，即可补液，如有大量较大的克隆团，可适当打散（下同），

转移细胞至 T175 培养瓶中，补加 45ml 培养基（含 NKT-E），一支 NKT-C 和 5ml 自体血浆混匀；

- 6.5 D5, 补加 110ml 培养基 (含 NKT-E), 加入一支 NKT-D 和 10ml 自体血浆, 混匀;
- 6.6 D7, 补加 200ml 培养基 (含 NKT-E) 和 10ml 自体血浆, 混匀, 转入细胞培养袋;
- 6.7 D9, 往细胞培养袋补加 400ml 培养基 (含 NKT-E) 和 10ml 自体血浆, 混匀; 自体血浆如用完可不添加或用免疫细胞专用细胞营养添加物 (货号: 666072) 替代 (下同);
- 6.8 D11, 往细胞培养袋补加 800ml 培养基 (含 NKT-E) 和 20ml 自体血浆, 混匀;
- 6.9 D13, 往细胞培养袋补加 400ml 培养基 (含 NKT-E) 和 10ml 自体血浆, 混匀;

8. 收获

D14 收获 NKT 细胞, 可根据实验情况, 适当提前或延迟。