

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 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-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)	1	支	-20℃	冻干粉
NKT-F (665077)	1	支	-20℃	冻干粉

2.2 用户需要自行准备的试剂耗材

NKT Cell Culture Medium (665071)、0.4%苕盼蓝溶液、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。

SIMPSON

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）

4.1 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；

4.2 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；

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

4.4 去上清，加入生理盐水至 45ml，充分混匀，取样计数；

4.5 1400rpm，10min 收集 PBMC。

5. 培养基使用说明：

第一瓶培养基 {NKT Cell Culture Medium™ (665071)} 加入一支 NK-E (665076)，混匀，使用前恢复至室温；

第二瓶培养基 {NKT Cell Culture Medium™ (665071)} 加入一支 NK-F (665077)，混匀，使用前恢复至室温；

培养基按顺序配置，现用现配。

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

7.1 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，

SIMPSON

可适当打散（下同），转移细胞至 T175 培养瓶中，补加 45ml 已配置培养基，一支 NKT-C 和 5ml 自体血浆混匀；

7.2 D5，补加 110ml 已配置培养基，加入一支 NKT-D 和 10ml 自体血浆，混匀；

7.3 D7，补加 200ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，转入细胞培养袋；

7.4 D9，往细胞培养袋补加 400ml 已配置培养基和 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）；

7.5 D11，均分2袋，每袋补加400ml 已配置培养基和 5ml 自体血浆，混匀；

7.6 D13，每袋补加 500ml 已配置培养基和 5ml 自体血浆，混匀；

7.7 D15，剩余培养基均分到2个培养袋中

8. 收获

D17 收获 NKT 细胞，可根据实验情况，适当提前或延迟。