

CIK 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

CIK Cell Robust Expansion Kit

(货号：662070)

1. 产品介绍

- 1.1 本产品是一款 CIK 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 $6\times10^9$ - $8\times10^9$ ，细胞存活率95%以上，扩增倍数在500-1000 倍，CIK 细胞比例最高可达90%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分。

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 |
|----------------------------------|----|----|------|------|
| CIK Cell Culture Medium (662071) | 2  | 瓶  | 2-8℃ | 液体   |
| CIK-A (662072)                   | 1  | 支  | -20℃ | 液体   |
| CIK-B (662073)                   | 1  | 支  | -20℃ | 液体   |
| CIK-C (662074)                   | 1  | 支  | -20℃ | 冻干粉  |
| CIK-D (662075)                   | 1  | 支  | -20℃ | 冻干粉  |

2.2 用户需要自行准备的试剂耗材

0.4%苔盼蓝溶液、生理盐水、人淋巴细胞分离液、肝素钠采血管/100ml 采血袋、PBS、75cm<sup>2</sup> 悬浮培养瓶、175cm<sup>2</sup> 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：

单独取 40ml 培养基用于第一次接种；

第一瓶培养基 {CIK Cell Culture Medium (662071)} 加入一支 CIK-C (662074)，混匀，使用前恢复至室温；

第二瓶培养基 {CIK Cell Culture Medium (662071)} 加入一支 CIK-D (662075)，混匀，使用前恢复至室温；

现用现配。

### 6. 细胞接种

- 6.1 取 40ml 培养基（不加 CIK-C）加入 CIK-A (662072) 和 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  $1.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ；
- 6.3 转移混匀后的细胞悬液至悬浮细胞培养瓶，在缓慢平放于培养箱中培养。
- 6.4 24 小时后加入一支 CIK-B (662073)，混匀。

### 7. 补液

- 7.1 D3 (72h)，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 40ml 已配置培养基，5ml 自体血浆混匀；
- 7.2 D5，补加 100ml 已配置培养基，自体血浆 10ml，混匀；
- 7.3 D7，补加 200ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀；
- 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，均分于 2 个细胞培养袋；自体血浆如用完可不添加或用细胞营养添加物替代（下同）；
- 7.5 D11，往细胞培养袋补加 800ml 已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分于 2 个细胞培养袋；
- 7.6 D13，往细胞培养袋补加所有剩余已配置培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分于 2 个细胞培

养袋；

### 8. 收获

D15 收获 CIK 细胞，可根据实验情况，适当提前或延迟。