

NTK 细胞高效扩增试剂盒套装使用说明书

NKT Cell Robust Expansion Kit

(货号: 665070)

1. 产品介绍

- 1.1 本产品是一款 NKT 细胞高效扩增试剂盒套装。
- 1.2 本产品适用于人外周血/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 本产品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。

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)	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

0.4% 萘酚蓝、生理盐水、人淋巴细胞分离液、肝素钠(锂)采血管或 100ML 采血袋、PBS、T75cm² 悬浮培养瓶、T175cm² 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 进行离心，用吸管将上清液转移至新的离心管中，-20℃ 分装保存，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/CBMC 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/CBMC。

5. 完全培养基配置说明：

- 5.1 第一瓶培养基 {NKT Cell Culture Medium (665071)} 加入一支 NKT-E (665076)，充分混匀，配置成完全培养基，使用前恢复至室温；
- 5.2 第二瓶培养基 {NKT Cell Culture Medium (665071)} 加入一支 NKT-F (665077)，充分混匀，配置成完全培养基，使用前恢复至室温；
- 5.3 按顺序配置使用。

6. 细胞接种

- 6.1 D0（指接种当天），取 40ml 完全培养基加入 NKT-A(665072)和 NKT-B(665073)以及 5ml 自体血浆混匀待用；
- 6.2 用 6.1 配置的培养基重悬已经收集好的单个核细胞；调整细胞密度 $1.5-2.0 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ；（如初始细胞总数较少，按比例降低接种总体积，初始接种细胞总数不超过 $1 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ ）

6.3 转移混匀后的细胞悬液至 T75cm² 悬浮培养瓶，混匀，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，可适当打散（下同），转移细胞至 T175cm² 培养瓶中，补加 40ml 完全培养基，一支 NKT-C 和 5ml 自体血浆混匀；

7.2 D5，补加 80ml 完全培养基，加入一支 NKT-D 和 5ml 自体血浆，混匀；

7.3 D7，补加 140ml 完全培养基和 5ml 自体血浆，混匀；

7.4 D9，补加 300ml 完全培养基和 5ml 自体血浆，混匀，转入细胞培养袋，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，往细胞培养袋中补加 600ml 完全培养基和 5ml 自体血浆，混匀；

7.6 D13，分袋，每个细胞培养袋补加 400ml 完全培养基 5ml 自体血浆，混匀；

7.7 如需扩大培养体系（如 3L、4L、6L、8L），使用 NKT-F 因子配置完全培养基继续补液培养即可。

7.8 整体根据细胞密度适当补液，补液后细胞密度不低于 1.5×10^6 cell/ml；

8. 收获

收获 NKT 细胞，可根据实验情况，适当提前或延迟。

注意事项：

1、整个补液过程中，每次接种或补液体积因样本、增值速度、初始细胞总数等会发生变化，应维持补液后密度不低于 1.5×10^6 cell/ml；出现较多较大细胞团可适当打散，说明书 7 中的补液流程可根据实际细胞状况做调整。

2、分袋时间：根据试验的便利性，培养袋里面液体总体积达到 1000-1500ml 时分袋也可以，不局限于 7.6 中提到的 D13 天的分袋时间。

3、细胞培养袋中总体积在 1500-1600ml 能最大发挥培养基效果，不宜过满，当总体积过大还需要继续补液培养时应及时分袋培养。