

NKT 细胞培养试剂套装说明书

【产品名称】 NKT 细胞培养试剂套装

【产品货号】 MCM-001+MCF-009

【包装规格】

1 盒 NKT 细胞培养试剂盒：1 支试剂 A (0.5ml/支)、1 支试剂 B (0.5ml/支)、2 支试剂 C (1ml/支)。

2 瓶免疫细胞无血清培养基：1L/瓶。

【预期用途】

本细胞培养试剂套装用于 NKT 细胞培养, 经 14 天培养, 细胞扩增倍数达 1000 倍(30-50ml 血液分离的细胞扩增总数可达 50-80 亿), CD3+CD56+NKT 细胞比例 \geq 50%, 细胞活性 $>$ 95%。

【储存条件及有效期】

NKT 细胞培养试剂盒储存于 -20°C (长时间储存请置于 -80°C), 免疫细胞无血清培养基储存于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

有效期 12 个月。

【样本要求】

本试剂套装要求人新鲜外周血或新鲜脐带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。**特别要求血液采集抗凝剂不能含有 EDTA 和枸橼酸钠, 建议用肝素抗凝剂。**

【使用方法】

1. NKT 细胞培养瓶预处理: 将试剂盒中试剂 A 溶于 20ml DPBS 中, 转移至一个 T175 培养瓶中, 37°C 避光放置 2-3h, 或 4°C 避光放置 12h 以上 (推荐)。包被瓶有效期 3 天。
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 后吸取上层血浆备用。
 - 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) 后, 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, 第三层为透明分离液层, 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 DPBS 至 50ml, 600g 离心 10min, 弃上清液, 再用 50ml DPBS 重悬细胞, 500g 离心 10min, 弃上清液。
3. NKT 细胞培养基的配制: 每瓶 (1L) 免疫细胞无血清培养基中加入一支试剂 C、1ml (4 万 IU/ml) 庆大霉素, 配制成完全培养基。
4. NKT 细胞培养
 - 4-1. 吸出预处理的 T175 培养瓶中试剂, 用 10ml DPBS 润洗包被瓶一遍, 注意添加 DPBS 时, 请勿冲培养瓶底面。
 - 4-2. 将上述得到的淋巴细胞用 36ml NKT 细胞培养基重悬, 转移到 T175 培养瓶中, 同时加入试剂 B 及 4ml 自体血浆, 置于恒温培养箱 (37°C 、5.0% CO_2 、饱和湿度) 中培养。
 - 4-3. 第 2 天, 补加 54ml NKT 细胞完全培养基及 6ml 灭活血浆。
 - 4-4. 第 4 天, 补加 45ml NKT 细胞完全培养基及 5ml 灭活血浆。

- 4-5. 第 5 天, 将 T175 培养瓶中细胞完全吹打下来后, 瓶中加入剩余全部血浆, 转移至 1 个 2L 的细胞培养袋中, 补加 NKT 细胞完全培养基至 400ml/袋。
 - 4-6. 第 7 天, 培养袋补加 NKT 细胞完全培养基至 800ml/袋。
 - 4-7. 第 9 天, 培养袋补加 NKT 细胞完全培养基至 1400ml/袋。
 - 4-8. 第 11 天, 培养袋补加 NKT 细胞完全培养基至 2000ml/袋, 同时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
5. NKT 细胞收获
- 5-1. 第 14 天, 2000rpm×10min 离心条件收集 NKT 细胞, 然后以 2000rpm×8min 离心条件用生理盐水洗涤细胞 2 次, 细胞计数, 用生理盐水重悬细胞制成终制品, 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。培养基标签应清晰, 易识别, 液体应无渗漏。
2. 免疫细胞无血清培养基 PH 值: 6.4~8.3。
3. 免疫细胞无血清培养基渗透压 (mOsm/kgH₂O): 223~301。
4. 细菌内毒素: < 0.5EU/ml。
5. 细菌: 无细菌检出。
6. 真菌: 无真菌检出。
7. 支原体: 无支原体检出。
8. 细胞生长测试: 培养14天细胞扩增倍数达1000倍, 有效细胞 (CD3⁺CD56⁺表型NKT细胞) 比例≥50%, 细胞活性>95%。

【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℃条件下取出, 置于4℃条件下缓慢解冻; 培养基从冰箱取出后, 需待溶液温度升至室温时, 摇匀后使用。
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。

【标识的解释】无

【参考文献】

- [1] 于津浦, 任秀宝, 郝希山.NKT细胞-肿瘤过继免疫治疗的新希望[J].中国肿瘤临床, 2001, 28(7).
- [2] 康自珍,蔡海波,雷俊英,徐莉,谭文松. 体外大量扩增NKT细胞的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志. 2002(05).
- [3] Luk PH,Negrin RS.A novel population of expanded human CD3+ CD56+ cell derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with potent severe combined immunodeficiency. J Immunol . 1994,153(4):1687-96.

【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/>