AMMS® NKT 细胞培养试剂盒说明书

（AMMS® NKT cell culture kit）

1 标准操作规程摘要

1.1 操作过程主要包括分离淋巴细胞、补液、分瓶、装袋、补液、收获等步骤。

1.2 细胞培养日程如下：

第 0 天	分离淋巴细胞
第 1 天	启动扩增
第 4 天	第一次扩增
第 6 天	第二次扩增
第 8 天	第三次扩增
第 11天	第四次扩增
第 14、15天	收集细胞

2 主要仪器、 试剂和 耗材

注意：NKT细胞必须是在符合 GMP 条件的超净环境下制备。与细胞培养相关的材料必须是无菌、无致热原的，并严格按照操作说明书使用，有特殊说明的情况除外。

2.1 仪器

生物安全柜

水平低速离心机

二氧化碳培养箱

倒置显微镜

血细胞记数器

血细胞计数板

移液器

热合机

-20℃冰箱

4℃冰箱

生化培养箱

2.2 试剂组成：产品货号：AS-07

名称	数量	规格	保存条件	产品性状
无血清培养基	2瓶	1000mL	2-8℃	液体
A因子	1支	250uL	2-8℃	冻干粉
B因子	1支	250uL	2-8℃	冻干粉
C因子	2支	500uL	2-8℃	冻干粉
D因子	1支	500uL	2-8℃	冻干粉

2.3 耗材

细胞培养瓶（T225cm^2 ），细胞培养袋，移液管50mL、250mL离心管，5mL、50mL注射器，细胞筛网，血琼脂培养皿

2.4 原材料

静脉外周血

3 操作步骤

3.1 NKT 原代细胞的制备

3.1.1 以 100mL 外周血为例，如血量不同，可按此操作规程做相应调整。标记检菌平皿(编号/姓名/"原血"/日期)。

3.1.2 将 100mL 外周血，均匀分至 2 管，用移液管吸取少许原血(约 300μL)划线或滴入平皿进行检菌。然后，室温下，865g，离心 15 分钟(9,7，意指升 9 降 7，下同)。

3.1.3 将上层血浆转入离心管，56℃灭活 30min，865g，10min 离心，取上清备用。

3.1.4 使用等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀后，小心加到用 50mL 离心管分装的 15mL Ficoll 层上，使分层保持清晰。室温 865g，离心 20 分钟(9，3)。

3.1.5 吸取外周血单个核细胞(PBMC)层，尽量吸尽两液面交接处的细胞层，加 5mL 生理盐水吹打混匀，后加生理盐水稀释至 45mL。700g，离心 8 分钟(9，9)。相同方法再次洗涤细胞。

3.1.6 弃去上清后，用 5mL 无血清培养基重悬，定容 20mL，吸取少量细胞计数。

3.1.7 种瓶 将 20mL 已混匀的细胞加入到 225cm^2 培养瓶内，用 10mL 培养基清洗离心管，并入培养瓶内，视细胞数量多少，培养基终体积为 30-50mL。加入试剂 A（用 200uL 培养基复溶）、血浆 5-10mL，剩余血浆 4℃密封保存备用。在标记培养瓶侧壁后，将其放入 CO_2 培养箱内进行培养。查看并保持培养箱状态如下，温度：37± 0.5℃、湿度：大于 90%、CO_2 浓度：5%。

3.1.8 将加好样品的血琼脂平板正置放入 35℃恒温生化培养箱，记录放入日期及培养物品。隔夜后倒置，保留 48 小时。

计算细胞密度及细胞数量

细胞浓度(个/mL)=N/4×稀释总倍数×10^4

细胞数量(个)= 细胞浓度(个/mL) ×细胞悬液总体积(mL)

3.2 NKT 细胞启动扩增

3.2.1 在培养的第 1 天加入试剂 B，并在瓶体侧面标上添加日期，放入 CO_2 培养箱内继续培养。

3.2.2 扩增液的配制：将两份试剂 C 分别加入两瓶培养基，试剂 D 复溶后均分成 2 份分别加入两瓶培养基中。

3.3 第一次扩增，主要为补液操作，将培养基扩增至 150mL，再加入灭活血浆 10mL

3.3.1 细胞培养第 4 天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养液变黄，可以开始扩增。若生长一般或较差，考虑减量扩增或推迟扩增。

3.3.2 将细胞培养基放至室温，与 50 毫升离心管(架)/检菌平皿/移液管/细胞培养瓶表面消毒后一并放入安全柜。

3.3.3 依次拧下培养瓶、50mL 离心管、细胞培养基瓶盖。用 50mL 离心管量取 100mL 的扩增液，倒入培养瓶中，加入灭活血浆 10mL。依次盖上培养瓶及培养基的瓶盖，轻摇培养瓶，使培养基混匀。在瓶体侧面标上培养代数 P1、日期，放入培养箱继续培养。

3.4 第二次扩增，主要为分瓶操作，将培养体系由 150mL 扩增 450m，加入剩余血浆(约 20mL)

3.4.1 细胞培养第 6 天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养液变黄，可以开始扩增。若生长一般或较差，考虑减量扩增或推迟扩增。

3.4.2 拧紧瓶盖，从 CO_2 培养箱内取出细胞培养瓶，与其它所需材料一并表面消毒后，移入生物安全柜。

拍打瓶壁，使细胞尽量从瓶底脱落，加入灭活血浆约 20mL，拧紧瓶盖，轻摇混匀，然后将细胞悬液平均转移至 3 个 175cm^2 的培养瓶内，并在各瓶中分别补入扩增液 100mL，使培养体系增至 450mL。在瓶体侧面标上培养代数 P2、日期，放入培养箱内继续培养。

3.5 第三次扩增，主要为装袋、分瓶操作，将培养体系由 450mL 扩增至 1000mL

3.5.1细胞培养第8天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养液变黄，可以开始扩增。若生长一般或较差，考虑减量扩增或推迟扩增。

3.5.2 拧紧瓶盖，从CO_2 培养箱内取出细胞培养瓶，与其它所需材料一并表面消毒后，移入生物安全柜。

拍打瓶壁，使细胞尽量从瓶底脱落。打开培养袋包装，做好标记，注明病人姓名、CIK细胞编号、操作项目名称、日期等。

3.5.3 拧下管口盖子，将盖子小心倒置在洁净区域，防止在其上方经过。

3.5.4 将管口与已拔出内芯的 50mL 注射器头连接好，瓶中 450ml 细胞悬液倒入袋中，并向袋内加扩增液 550mL，最后将培养袋的管口盖子盖好，拧紧。

3.5.5 在培养袋取样口(可插针头的管子顶端)，用 5mL 注射器抽取少量细胞悬液加至血平板上检菌，并做好标记。

3.6 第四次扩增，主要为补液操作，将培养体系由 1000mL 扩增至 2000mL

3.6.1 细胞培养第 11 天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养液变黄，可以开始扩增。若生长一般或较差，考虑减量扩增或推迟扩增。

3.6.2 将培养袋从培养箱中取出，表面酒精消毒后，移入生物安全柜，拧开细胞培养袋管口的封盖并与已拔出内芯的 50mL 注射器头连接好，将细胞悬液均匀分至 2 个培养袋中，并等体积补液。

3.6.3 将两袋细胞放入培养箱中继续培养。标记培养袋数 P4 及第四次扩增日期。

3.7 检菌

3.7.1 细胞培养第 13 天，对细胞悬液进行检菌、内毒素检测。

3.7.2 做好标记，注明患者姓名、编号、操作项目名称、日期等。

3.7.3 用 5mL 注射器分别从培养瓶和袋内抽取少量细胞悬液，加入正置的平皿中，放入 35℃恒温生化培养箱，记录放入日期及培养物品。隔夜后倒置，保留 48 小时。

3.8 收获

3.8.1 正常情况下，第 14 天回收培养袋内 1000mL 细胞悬液，第 15 天收获另一袋 1000mL 细胞悬液。若因实验需要，可相应提前或延迟。

3.8.2 将此项操作所用材料，包括细胞培养袋、细胞培养瓶、250 毫升离心管(架)，表面消毒后移入安全柜。

3.8.3 调整安全柜挂钩位置，使挂钩处于便于操作的位置，仔细用酒精棉球擦拭剪刀刃部，并挂至最右侧挂钩上。

3.8.4 将培养袋竖直提起，轻弹连接管根部，使管内液体流回培养袋，至少在远端留出 3 厘米空段，用止血钳将此段夹死。调整止血钳方向使空段处于易于消毒的位置。

3.8.5 反复轻柔按压培养袋，使其中的细胞尽量悬浮混匀。酒精棉球仔细擦拭连接管空段，待酒精挥发殆尽。对 250mL 离心管进行标记，以防混淆。

3.8.6 拧下离心管瓶盖，将其放至安全柜右侧洁净区，使此后的操作尽量不会经过瓶盖上方。离心管刻度面向操作者，便于观察。

3.8.7 小心取下剪刀，剪掉管子止血钳夹持远端部分，使细胞培养袋内的液体可以被止血钳控制而不能流出。将剪刀放回原位。

3.8.8 右手取下并把持止血钳，左手固定靠近止血钳近端连接管，末端处于离心管口正上方。打开止血钳，并同时控制管口方向和液体流速，待细胞悬液流入 4 个 250mL 离心管中，用止血钳夹死末端，并将止血钳挂回。视细胞生长情况，是否需要再向另一袋内补≤200mL 扩增液。用热合机将用完的培养袋连接管末端封死，弃去。细胞悬液 700g，离心 8 分钟。

3.8.9 在离心时，进行如下操作：撕去细胞转移袋外包装，做好标记，与注射器/筛网/冻存管/EP 管/生理盐水/移液管/白蛋白消毒后放入安全柜。

3.8.10 用止血钳夹持细胞转移袋连接管，用酒精湿巾消毒止血钳远端部分。消毒剪刀刃部，挂至挂钩。隔包装调整细胞筛网握持部分位置，使之在撕开外包装后可直接夹持。

3.8.11 使用生理盐水时，先在操作面上铺一张酒精湿巾，打开生理盐水铝制封口，将取下的铝制封口均放至其上。用酒精棉球擦拭瓶盖，清除碎屑。

3.8.12 将离心管(架)表面消毒后移入安全柜，检查细胞沉淀，倾去上清液，振荡悬浮细胞沉淀。向①管加入生理盐水 25mL，将细胞沉淀吹打混匀，用移液管转入②管中，再重复洗涤①管两次；按上述步骤处理③管和④管。最终所有洗液合并入②④，每管 75mL。

3.8.13 将②④管移出安全柜，室温，700g，离心 8 分钟。

3.8.14 离心管(架)表面消毒后再次移入安全柜，检查细胞沉淀，倾去上清液，振荡悬浮细胞沉淀。向②管加入生理盐水 25mL，吹打混匀后将其加入④管中，再重复洗②管三次，依次加入④管中，定容 100ml，在此步骤可进行取样计数。

3.8.15 将④管移出安全柜，室温，700g，离心 8 分钟。

3.8.16 将离心管(架)表面消毒后移入柜中，冻存管留样 1mL 上清液，做内毒素检测。

3.8.17 检查细胞沉淀，倾去上清液。加入生理盐水混匀细胞，定容 50mL。并用 2ml 移液管吸取白蛋白 0.5mL(20%)，加入生理盐水中。

3.8.18 转移袋连接管与已拔除内芯的 50mL 注射器连接，在注射器开口端放置细胞筛网，然后将④管中细胞悬液全部通过注射器倒入袋中，然后清洗离心管 2 次，每次 25ml 生理盐水，依次倒入袋中。待细胞悬液全部流入转移袋后，用止血钳夹住连接管，再用热合机在转移袋近端 2~3 厘米的位置连封两道，将多余管子剪掉。此时袋内约 100mL 细胞白蛋白悬液即为培养最终产品，贴好标签。

若您在进行预实验之前，如有疑问可与我司技术部门电话联系 010-5365 6596 徐榕 王志荣