

AMMS® NKT 试剂盒套装使用说明书

(货号: AS-07F)

研究背景与目的

NKT 细胞是一群具有 NK 细胞特性的 T 细胞亚群。NKT 细胞培养试剂盒采用自体外周血细胞中分离得到的单个核细胞，经体外扩增培养后，获取以 CD3⁺CD56⁺为主要标志的细胞效应群。本试剂盒采用纯因子法培养 NKT 细胞，操作简单，仅限体外研究使用。

产品特点

- 1、细胞最终扩增量可达 $4\sim 10\times 10^9$;
- 2、培养体系稳定，培养后的细胞表型稳定;
- 3、ISO 13485 医疗器械质量管理体系认证;
- 4、GMP 制药级生产环境，批次稳定性高;

套装组成:

AMMS® NKT 细胞培养试剂盒 (货号: AS-07)

试剂盒内容	规格	数量	保存条件	产品性状
NKT 试剂 A	500uL	1 支	2-8℃	冻干粉
NKT 试剂 B	500uL	1 支	2-8℃	冻干粉
NKT 试剂 C	500uL	2 支	2-8℃	冻干粉
NKT 试剂 D	500uL	1 支	2-8℃	冻干粉

AMMS® NKT 无血清培养基 (货号: AS07-2)

套装内容	规格	数量	保存条件	产品性状
AMMS®NKT 无血清培养基	1000mL	2 瓶	2-8℃	液体

NKT 细胞培养流程



分离 PBMC

NKT 原代细胞的制备（第 0 天）

- 1、分离血浆。将血样转移至离心管，同时吸取少许原血(约 300 μL)划线或滴入平皿进行检菌。室温下离心，离心结束后取上层血浆。
- 2、血浆灭活。56℃灭活 30min，再置于 4℃冰箱 30min，室温下离心，取上清备用。
- 3、分离 PBMC。使用等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀后，小心加到 Ficoll 层上，使分层保持清晰。室温下离心。
- 4、洗涤细胞。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，加生理盐水吹打混匀，室温下离心。相同方法再次洗涤细胞两遍。
- 5、细胞计数。洗涤细胞过程中吸取少量细胞计数。
- 6、种瓶。离心后去上清，用适量细胞培养液重悬细胞沉淀，保证细胞密度 $1-2 \times 10^6$ 个/mL，加入 NKT 试剂 A、血浆（血浆浓度为培养体积的 5%），将细胞悬液并入培养瓶中，终体积定容到 30-50mL，同时留样检菌，剩余血浆 4℃密封保存备用。在标记培养瓶侧壁后，将其放入 CO₂ 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>90%、CO₂ 浓度：5%。

计算细胞密度及细胞数量

细胞浓度(个/mL)=N/4×稀释总倍数×10⁴

细胞数量(个)= 细胞浓度(个/mL) ×细胞悬液总体积(mL)

启动扩增

细胞培养第 1 天，将溶解后的 NKT 试剂 B 加入培养瓶中，放入 CO₂ 培养箱内继续培养。

培养

NKT 第一次扩增（第 3 天）：主要为补液操作，将培养基进行对倍扩增，再加入补液体积 5%的灭活血浆

- 1、细胞培养第 3 天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养基变黄，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。
- 2、补液。补加对倍体积的扩增培养基，其中含有 NKT 试剂 C，D 及补液体积 5%的血浆。

注 *扩增培养基的配制：将第 1 支 NKT 试剂 C 加入第一瓶培养基中，将 NKT 试剂 D 复溶后均分成 2 份，其中一份加入到含有 NKT 试剂 C 的培养基中，另一份-20℃保存备用。

NKT 第二次扩增（第 5 天）：主要为补液操作，将培养基继续对倍扩增，再加入补液体积 5%的灭活血浆

- 1、细胞培养第 5 天，显微镜下观察无异常情况，细胞生长良好，培养基变黄，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。
- 2、补液。补加对倍体积的扩增培养基，其中含有 NKT 试剂 C，D 及补液体积 5%的血浆。

装袋

NKT 第三次扩增（第 7 天）：主要为装袋操作，将培养体系扩增至 300-500mL

- 1、细胞培养第 7 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。
- 2、装袋。细胞装袋前将培养瓶中细胞轻微吹散，切勿剧烈吹打，随后将培养瓶中全部的细胞悬液及对应的扩增液一起装入培养袋中，取样检菌，装袋细胞将袋子相应进行折叠后放入培养箱继续培养。

补液

NKT 第四次扩增（第 9 天）：主要为补液操作，将培养体系由扩增至 800-1000mL

- 1、细胞培养第 9 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。
- 2、补液。将培养袋从培养箱中取出，补加培养基 800-1000mL，取样检菌，将细胞袋放入培养箱继续培养。

分袋

NKT 第五次扩增（第 11 天）：主要为分袋操作，将培养体系由扩增至 2000mL

- 1、细胞培养 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。
- 2、补液。将培养袋从培养箱中取出，将培养袋中细胞悬液取出一半加入新的培养袋中，每袋再补加扩增培养基至 1L，取样检菌，将细胞袋放入培养箱继续培养。

注 *扩增培养基的配制：将第 2 支 NKT 试剂 C 加入第二瓶培养基中，将保存于-20℃的另一半 NKT 试剂 D 加入到含有 NKT 试剂 C 的培养基中。

检菌（第 13 天）

- 1、细胞培养第 13 天，对细胞悬液进行检菌、内毒素检测。
- 2、用 5mL 注射器分别从两个培养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。

收获

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。

电话：010-88681766