

# 人 NKT 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

## 【产品名称】

中文名称：人 NKT 细胞高效扩增试剂盒

英文名称：Human NKT cell robust expansion kit

## 【编号】

CT-017

## 【包装规格】

2L/套

## 【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
NKT-I	无色透明液体	200 $\mu$ L/支	1 支
NKT-II	无色透明液体	100 $\mu$ L/支	1 支
NKT-III	无色透明液体	200 $\mu$ L /支	1 支
NKT-IV 培养基	红色澄清液体	1L/瓶	2 瓶

## 【预期用途】

适用于从人新鲜外周血、新鲜脐血、浓缩白细胞来源的单个核细胞以及冻存的外周血或脐血源单个核细胞在体外扩增成 NKT 细胞。

## 【贮藏条件与有效期】

试剂盒中 NKT-I, NKT-II, NKT-III 及 NKT-IV 培养基均置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期为 12 个月。

生产日期, 有效期至: 见标签。

## 【产品简介】

NKT 细胞(Natural killer T cell)是一个具有 NK 细胞特性的 T 细胞亚群。是先天免

疫系统的重要组成部分，同时又是联系固有免疫和获得性免疫的桥梁之一，是一种细胞表面既有 T 细胞受体 TCR，又有 NK 细胞受体的特殊 T 细胞亚群。NKT 细胞受到刺激后，可以分泌大量的 IL-4, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-13 和其它细胞因子和趋化因子，参与自身免疫性疾病的发生、肿瘤免疫以及对病毒、细菌、真菌和寄生虫病原体的免疫防护。NKT 细胞具有 T 细胞 MHC 限制性杀伤特点，同时活化后具有 NK 细胞样细胞毒活性，可溶解 NK 细胞敏感的靶细胞，主要效应分子为穿孔素，Fas 配体以及 IFN- $\gamma$ 。本试剂盒适用于从单个核细胞在体外高效获得大量纯度较高的 NKT 细胞。

## 【操作步骤】

### 一 血浆的提取与保存

注意：

- 1) 禁止使用 EDTA 抗凝的血样，因为 EDTA 会极大影响 NKT 细胞的激活与增殖；
- 2) 所取血样最好不超过 12 小时，因为血样的时间越长，所提取的单个核细胞中杂细胞越多，且单个核细胞的活性会降低；

1. 将取到的 50-60mL 外周血置于 50mL 离心管中，室温下 650g，离心 15min；
2. 取上层黄色血浆部分于新的 50mL 离心管中（下层为血液细胞成分，用于后续单个核细胞的提取）；
3. 将血浆置于 56° C 水浴锅中灭活 30min；
4. 血浆灭活完毕后，可见血浆呈现浑浊状，900g，离心 10min；
5. 取上清，于 4° C 保存待用。

### 二 单个核细胞的提取

1. 取血浆提取步骤的下层红色细胞沉淀，加入生理盐水或 PBS 至原体积；
2. 取 2 支 50mL 离心管，分别加入 15mL 淋巴细胞分离液，并将 1 步骤中的稀释血液分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层；

**注意：**铺加血样时建议速度适中，尤其是刚开始时的铺加，避免破坏淋巴细胞分离液与血样的界面。

3. 室温下，800g 离心 20min（升速 1-5，无闸减速）；

**注意：**过快的升速会减少后续单个核细胞的收获量

4. 离心后，离心管中样品由上到下分为 4 层：血浆层-白膜层-人淋巴细胞分离液层-红细胞与粒细胞的沉淀。分别小心吸取白膜层及其以下约一半的液体于新的离心管中，并加入

生理盐水或 PBS 至 40mL 体积，混匀，300g 离心 10min；

5.弃上清，沉淀再次用 40mL 的生理盐水或 PBS 重悬，300g 离心 10min；

**注意：**对于血小板较多的样本可重复 5 步骤 1-2 次。

6.弃上清，沉淀少许 NKT-IV 培养基重悬，合并，取部分细胞悬液计数，备用。

### 三 单个核细胞接种与补液

**1.1.第 0 天**，配制 50mL NKT 细胞完全培养基：NKT-IV 培养基 45mL，10%已热灭活的自体血浆（5mL），NKT-I 200 $\mu$ L，NKT-II 100 $\mu$ L，NKT-III 200 $\mu$ L 以及终浓度为 1000IU/mL 的 IL-2。将制备好的单个核细胞（MNC）按 1.5-2.0M cells/mL 的细胞密度接种于 50mL 已配制好的 NKT 细胞完全培养基中，混合均匀后转移至 T75 瓶中，而后再将 T75 瓶转移至 5% 二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养；

**注意：**

1) 每支 IL-2 使用 1mL NKT-IV 培养基溶解后，可存于 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱，存放时间不超过 1 周。建议将 IL-2 溶解后分装于无菌试剂管后保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱，使用时溶解即可，注意不要反复冻融，且不可使用长期置于 2-8 $^{\circ}$ C 的 IL-2，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果；

2) NKT-IV 培养基在使用前，需先将其室温平衡 30min 以上，切勿将培养基直接从冰箱中拿出使用，否则可能导致细胞出现应激反应。

**2.第 3 天（3 $\times$ 24h）**，补加 NKT-IV 培养基 95mL，5%已热灭活的自体血浆（5mL）以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），转入细胞培养袋，此时培养袋含 150mL 培养基；

**3.第 5 天**，补加 NKT-IV 培养基 150mL，1%已热灭活的自体血浆 1.5mL 以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），此时袋子含 300mL 培养液；

**注意：**

为使更多的细胞转入到培养袋中，可先将 T-75 瓶中的细胞吹打均匀，全部转入培养袋中，再用部分新鲜配制的培养液润洗培养瓶，并再次转入培养袋中，最后补齐培养液即可；

**4.第 7 天**，往培养袋补加 NKT-IV 培养基 300mL，剩余的所有自体热灭活血浆以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），然后分成两袋，此时每个袋子约含 300mL 培养液；

**5.第 9 天**，分别往每个培养袋补加 NKT-IV 培养基 300mL 以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），此时每个袋子约含 600mL 培养液；

**6.第 11 天**，分别往每个培养袋补加剩余 NKT-IV 培养基以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），此时每个袋子约含 1000mL 培养液；

7.第 14 天，收获 NKT 细胞。

本试剂盒无配备 IL-2，客户需自行购买添加。

#### 【注意事项】

1. 使用本试剂盒时，可先将 NKT-I, NKT-II, NKT-III 试剂管低速离心（如 1000g/min 离心 1min 等），确保试剂足量；
2. 由于样本之间的差异性，在按上述说明操作时，可根据具体细胞生长状态，调整补液时间；
3. 在使用本试剂盒时，由于样本之间的差异性，每个样本的细胞长速与诱导率存在差异。

#### 【产品性能指标】

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

本产品仅限科学研究使用，不用于临床诊断与治疗。

#### 【生产企业】

企业名称：福建三一造血技术有限公司

生产地址：福建省福州市高新技术产业园创新园 10 号楼

邮政编码：350108

电话号码：（0591）22889285/4001155980

邮箱地址：sales@stemery.cn

网址：<http://www.stemery.cn>

