

AMMS® NKT 试剂盒套装说明书

说明书编号: DS-Kit-AS07F-A/0

产品名称

通用名称: AMMS®NKT 试剂盒套装

英文名称: AMMS®NKT Cell Culture Kit

产品信息

套装货号: AS-07F

套装组成:

AMMS® NKT 细胞培养试剂盒 (货号: AS-07)

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NKT 试剂 A	AS07A	500μL	1 支	2~8℃	冻干粉	24 个月
NKT 试剂 B	AS07B	500μL	1 支	2~8℃	冻干粉	24 个月
NKT 试剂 C	AS07C	500μL	2 支	2~8℃	冻干粉	24 个月
NKT 试剂 D	AS07D	500μL	1 支	2~8℃	冻干粉	24 个月

AMMS® NKT 无血清培养基 (货号: AS07-2)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
AMMS® NKT 无血清培养基	AS07-2	1000mL	2 瓶	2~8℃	液体	18 个月

产品描述

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。

使用说明

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 300μL) 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 $1\sim2\times10^6$ 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)= $N/4 \times \text{稀释总倍数} \times 10^4$

细胞数量(个)= 细胞浓度(个/mL) $\times$ 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。