产品说明书

新鲜型 CIK 细胞培养试剂盒-3L 体系

货号：GD-E1

个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室
WWW.NLAELPCT.COM

产品描述

由个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室精心开发的新鲜型 CIK 细胞培养试剂盒，包括了激活、诱导和扩增需要的细胞因子和必要的培养基、培养添加物。

本产品可刺激通过人淋巴细胞分离液（Ficoll）分离获得的新鲜单个核细胞诱导分化为细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK 细胞）。

本产品仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床、家庭以及其他用途。

试剂盒组成成分

序号	试剂名称	数量
1	FCIK-1	1 支
2	FCIK-2	1 支
3	FCIK-3	3 支
备注	请配合配套的 CIK 细胞培养基（3 瓶）使用	

使用说明

- 所有工作必须在无菌环境中进行，请遵守严格无菌的工作规范，使用无菌耗材。

诱导用 CIK 培养基的配制

1. 使用前，请将 FCIK-2 置于室温环境解冻至因子完全溶解，轻轻地上下颠倒试剂管以确保试剂混合均匀。
2. 用 75%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁，室温放置数秒使酒精挥发。
3. 在洁净工作台中吸取 140mL 的 CIK 培养基。
4. 无菌吸取 1 支 FCIK-2 加入 140mL 的 CIK 培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
5. 轻晃配制好的诱导用 CIK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配制完成的培养基于 4°C 保存。

扩增用 CIK 培养基的配制

1. 使用前，请将 FCIK-3 置于室温环境解冻至因子完全溶解，轻轻地上下颠倒试剂管以确保试剂混合均匀。
2. 用 75%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁，室温放置数秒使酒精挥发。
3. 无菌吸取 FCIK-3 加入培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
4. 每 800~1000mL 的 CIK 培养基加入 1 支 FCIK-3。
5. 轻晃配制好的扩增用 CIK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配制完成的培养基于 4°C 保存。

操作规程

实验材料

1. 新鲜型 CIK 细胞培养试剂盒（货号：GD-E1）；
2. CIK 培养基（货号：GD-C2）；
3. 细胞培养瓶（175cm^2）；
4. 细胞培养袋；
5. 离心管（50mL、250 mL）；
6. 一次性注射器（60mL）；
7. 人淋巴细胞分离液（Ficoll）；
8. 0.9%氯化钠注射液。

操作方法

1. 单个核细胞分离
   a) 在生物安全柜中将抗凝血转移至 50mL 离心管中（约 30mL/管），随机取样计数。
   b) 室温离心 900g，15min。
   c) 血浆的灭活处理

i. 离心后的血浆转移至 50mL 离心管，封口膜封口后放置到 56°C 水浴锅静置 30min。

ii. 取出后放置到-20°C 静置 10min。

iii. 4°C 离心 1100g，15min。

iv. 将离心后的上清吸取到 50mL 离心管后，4°C 保存备用。

d) 每管剩余的血细胞沉淀按照 1：1 的比例加入 0.9%氯化钠注射液（定容体积约 30mL/管），混匀后轻柔平铺到预先加入人淋巴细胞分离液的离心管内（每管装有 15mL 人淋巴细胞分离液）。

e) 室温离心 600g，15min（缓慢降速以避免破坏分层）。

f) 吸取单个核细胞层至 50mL 离心管，加入 0.9%氯化钠注射液定容到 50mL 后混匀。

g) 室温离心 600g，10min。

h) 弃去离心上清后，使用诱导用 CIK 培养基重悬细胞沉淀并定容至 30mL,取样计数。

2. 细胞接种（第 0 天）

a) 将重悬的细胞全部接种至 T175 培养瓶中，加入 5mL 灭活血浆和 1 支 FCIK-1 因子。

b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。

3. 培养瓶加液（第 2 天）

a) 往培养瓶中加入 40mL 诱导用 CIK 培养基和 5mL 灭活血浆。

b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。

4. 培养瓶加液（第 4 天）

a) 往培养瓶中加入 70mL 诱导用 CIK 培养基和剩余全部灭活血浆。

b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。

5. 转入细胞培养袋（第 6 天）

a) 转袋操作前请先取样计数，如细胞密度低于 $0.5*10^6$/mL 需延迟转袋。

b) 将所有细胞平均转移至 2 个培养袋内。

c) 分别往 2 个培养袋内加入 320mL 扩增用 CIK 培养基。

d) 轻柔摇匀，放入 37°C，5%CO_2 培养箱。

6. 培养袋补液（第 9 天）
   a) 分别往 2 个培养袋内加入 400mL 扩增用 CIK 培养基。
   b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱。
7. 培养袋补液（第 11 天）**【仅适用于外周血来源】**
   a) 分别往 2 个培养袋内加入 700mL 扩增用 CIK 培养基。
   b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。
8. 培养袋补液（第 11 天）**【仅适用于脐带血来源】**
   a) 分别往 2 个培养袋内加入 400mL 扩增用 CIK 培养基。
   b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。
9. 培养袋补液（第 14 天）**【仅适用于脐带血来源】**
   a) 分别往 2 个培养袋内加入 300mL 扩增用 CIK 培养基。
   b) 轻柔摇匀后放入 37°C，5%CO_2 培养箱中培养。
10. 细胞收集
   a) 外周血来源的在第 14 天进行细胞收集，脐带血来源的在第 16 天进行细胞收集。
   b) 将培养袋内细胞培养基全部收集至 250mL 离心管内，取样计数。
   c) 室温离心 500g，8min。
   d) 吸出上清液后用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个 250mL 离心管中并分别定容至 200mL。
   e) 室温离心 500g， 8min。
   f) 小心吸出上清液，用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个 50mL 离心管中并分别定容至 50mL。
   g) 室温离心 300g,，8min。
   h) 弃去上清，按照预期用途使用适合的液体重悬保存细胞，取样计数。

注意事项

1. 血液样本体积（不含抗凝剂）建议不少于 50mL。
2. 第 6 天转袋操作前取样计数，如细胞密度低于 $0.5*10^6$/mL 时推荐延迟 1-2 天进行操作。

3. 第 9 天及以后的补液建议在操作前取样计数，如细胞密度低于标准时推荐延迟 1-2 天进行操作。（外周血来源的细胞密度标准为 $1*10^6$/mL，脐带血来源的细胞密度标准为 $2*10^6$/mL）
4. 外周血来源的 CIK 细胞如需分 2 次收集，可在第 14 天混匀细胞袋内细胞后收集 1400mL（700mL/袋），再分别往 2 个培养袋内各加入 300mL 扩增用 CIK 培养基；在第 16 天收集剩余全部细胞。
5. 收集的 CIK 细胞如需冻存，推荐使用无血清细胞冻存液（货号 GD-D1）。
6. 试剂盒内的因子请在-20°C 及以下温度保存，有效期为 1 年。
7. 试剂盒内请在有效期内使用。
8. 本说明书会随着研究的进步持续更新，最新的说明书请关注“个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室”公众号获取。