

# 产品说明书

新鲜型 CIK 细胞培养试剂盒-10L 体系

货号: GD-E2

室



# 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	9支
4	FCIK-4	1支
备注	请配合配套的 CIK 细胞培养基(10 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 A 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。

## 扩增用 CIK 培养基 B 的配制

- 1. 使用前,请将 FCIK-4 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-4 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-4。
- 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-E2);
- 2. CIK 培养基(货号: GD-C2);
- 3. 细胞培养瓶 (175cm²);
- 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%CO2 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%CO2 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%CO2 培养箱中培养。
- 5. 转入细胞培养袋(第7天)
  - a) 转袋操作前请先取样计数,如细胞密度低于 0.5\*10<sup>6</sup>/mL 需延迟转袋。
  - b) 将所有细胞平均转移至 4 个培养袋内。
  - c) 分别往 4 个培养袋内加入 160mL 扩增用 CIK 培养基 A。
  - d) 轻柔摇匀, 放入 37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱。
- 6. 培养袋补液 (第9天)
  - a) 分别往 4 个培养袋内加入 800mL 扩增用 CIK 培养基 A。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37°C, 5%CO2 培养箱。
- 7. 培养袋补液 (第12天)【仅适用于外周血来源】
  - a) 分别往 4 个培养袋内加入 1000mL 扩增用 CIK 培养基 A。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37°C, 5%CO2培养箱中培养。
- 8. 第一次细胞收集
  - a) 外周血来源的在第 15 天进行细胞收集,
  - b) 混匀后从每个培养袋内收集 750mL 细胞培养基至 250mL 离心管内,取样计数。
    - i. 收集后分别往 4 个培养袋内加入 250mL 扩增用 CIK 培养基 B。
    - ii. 轻柔摇匀后放入 37°C, 5%CO2 培养箱中培养。
  - 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。

#### 9. 第二次细胞收集

#### a) 外周血来源的在第 17 天进行细胞收集,

- b) 混匀后从每个培养袋内收集 750mL 细胞培养基至 250mL 离心管内,取样计数。
  - i. 收集后分别往 4 个培养袋内加入 250mL 扩增用 CIK 培养基 A。
  - ii. 轻柔摇匀后放入37°C,5%CO2培养箱中培养。
- 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。

#### 10. 第三次细胞收集

#### a) 外周血来源的在第 19 天进行细胞收集,

- b) 混匀后从每个培养袋内收集全部细胞培养基至 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<sup>6</sup>/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<sup>6</sup>/mL,脐带血来源的细胞密度标 准为2\*10<sup>6</sup>/mL)
- 4. 仅第一次收集后使用扩增用 CIK 培养基 B 进行补液。
- 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。