

人 CIK 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

【产品名称】

中文名称：人 CIK 细胞高效扩增试剂盒

英文名称：Human CIK cell robust expansion kit

【编号】

NXC-009

【包装规格】

2L/套

【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
CIK-I 因子	无色透明液体	100 μ L/支	1 支
CIK-II 因子	无色透明液体	100 μ L /支	1 支
CIK 细胞无血清培养基	红色澄清液体	1L/瓶	2 瓶

【预期用途】

适用于从人单个核细胞（MNC）在体外高效扩增成 CIK 细胞。

【贮藏条件与有效期】

CIK-I 因子，CIK-II 因子与 CIK 细胞无血清培养基均需 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存。有效期为 12 个月。

生产日期，有效期至：见标签。

【产品简介】

细胞因子诱导杀伤性细胞（CIK 细胞）是一个异质细胞群，包含 CD3+CD56+NK 样 T 细胞和 CD3+CD8+细胞毒性杀伤作用 T 细胞，具有杀伤肿瘤具有 MHC 限制性和非 MHC 限制性的特点，CIK 细胞对各种肿瘤尤其是对低表达 MHC I II 分子更有效。本试剂盒可以从单个核

细胞（MNC）在体外高效扩增成 CIK 细胞，为免疫学研究提供了一个有力工具。

【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 CIK 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，沉淀用少许 CIK 细胞无血清培养基重悬，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.第 0 天，配制 50mL CIK 细胞完全培养基：CIK 细胞无血清培养基 45mL，10%已热灭活的

自体血浆（5mL），CIK-I 100 μ L，CIK-II 100 μ L 以及终浓度为 1000IU/mL 的 IL-2。将制备好的单个核细胞（MNC）按 1.5M cells/mL 的细胞密度接种于 50mL 已配制好的 CIK 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 CIK 细胞无血清培养基溶解后，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) CIK 细胞无血清培养基在使用前，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 CIK 细胞无血清培养基 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；

注意：

- 1) 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；

3.第 5 天，补加 CIK 细胞无血清培养基 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；

4.第 7 天，补加 CIK 细胞无血清培养基 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 CIK 细胞无血清培养基 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 CIK 细胞无血清培养基以及 IL-2（IL-2 终浓度为 1000IU/mL），此时每个袋子约含 1000mL 培养液；

7.第 13-14 天，收获 CIK 细胞。

本试剂盒中不含 IL-2，需另外购买添加。

【注意事项】

1. 使用本试剂盒时，可先将 CIK-I，CIK-II 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；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。