

NKT 细胞制备标准操作流程

一、分离血浆

1. 将 50ml 抗凝血分装到 1 个 50ml 离心管中，400G, 10min, 升 8 降 6, 离心;
2. 将血浆移入新的 50ml 离心管中，封口膜封口;
3. 水浴锅 56 度, 30min 灭活;
4. -20 度放置 15min, 2000rpm, 10min 离心;
5. 将上清移入新的离心管中，放 4 度保存备用。

二、分离单个核细胞

1. 向取完血浆后的血细胞沉淀中按照 1:1 的比例加入 DPBS;
2. 反复颠倒 3—5 次混匀;
3. 50ml 离心管中预先加入 15ml Ficoll 分离液，小心缓慢加入 30ml 稀释后的血液（1:2）;
4. 400G, 30min, 缓升缓降，缓升为 1，缓降为 0。
5. 移液管将白膜层取出，补 DPBS 至 40ml, 1500rpm, 离心, 10min;
7. 弃上清，加入 20ml DPBS/管，悬浮细胞沉淀，合并细胞于 1 管中，再分别补加 DPBS 至总体积为 40ml/管，离心：1000rpm, 10min;
9. 去上清，细胞重悬于培养基中;

三、NKT 细胞培养

1. 包被培养瓶：取一支包被因子 NKT Coating factor cocktail 400 μ l 加入到 10ml DPBS，置于 T75 培养瓶中，4 度 16h 以上过夜包被，或者 37℃ 培养箱内快速包被 2h。
2. 待细胞准备好后，使用前倒掉包被液用 DPBS 洗涤一次;

3. 分离好的单个核细胞悬浮于 20ml novaT-15 基础培养基中，细胞浓度为 $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ ，加入 10%自体血浆，加入一支 400 μl NKT stimulation factor cocktail, 将细胞置于 T75 培养瓶中进行培养；
4. 培养 2 到 3 天，补加 30ml 新鲜完全培养基。
配置完全培养基，一瓶 novaT-15 基础培养基加入一支扩增因子 NKT Expansion factor cocktail 1ml；
5. 以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，并加 5%自体血浆。视细胞的诱导和增殖状况进行添液和扩瓶。一般等量补液扩瓶。
6. 当细胞扩增到一定数量可启动回输。质控点：回输前 3 天，检测无菌（厌氧菌和需氧菌），支原体。