

NK细胞活化/扩增试剂盒，人(92-01-0108)

[组分]

2 mL 细胞培养级抗生物素磁珠粒子，相当于 4×10^8 磁珠粒子；与单克隆抗生物素抗体偶联的磁珠粒子

0.4 mL CD335 (NKp46)-生物素，人—功能级 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

0.4 mL CD2-生物素，人—功能级 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

[保存形式] 所有试剂均在无叠氮缓冲液中供应，抗生物素磁珠粒子含有稳定剂。

[储存条件] $2 - 8^\circ\text{C}$ 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[原理]

NK 细胞活化/扩增试剂盒用于激活和扩增人 NK 细胞。该试剂盒由抗生物素磁珠粒子和针对人 CD335 (NKp46) 和 CD2 的生物素化抗体组成。装有生物素化抗体的抗生物素磁珠粒子用于激活和扩增从人血或外周血单个核细胞 (PBMC) 中纯化的静息 NK 细胞。

[背景信息]

第一步，在抗生物素磁珠粒子中加入生物素化抗体。使用等量的抗 CD335 (NKp46) 和 CD2 的生物素化抗体可达到最佳激活效果。

▲ 注：如有需要，可对其他生物素化抗体组合的适用性进行实验测试。

装载的抗生物素磁珠粒子随后用于扩增 NK 细胞。每两个细胞使用一个装载的抗生物素磁珠粒子（粒子与细胞的比例为 1:2），可实现 NK 细胞的最佳激活和扩增。培养细胞是为了进一步扩增。

使用抗生物素磁珠粒子激活的 NK 细胞可用于任何下游处理，如细胞因子分析、细胞溶解活性、基因表达或功能研究。

抗生物素磁珠粒子不会显示自发荧光，通常无需在流式细胞分析前去除。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液：配制含有 pH7.2 PBS、0.5% 人血清白蛋白（HSA）和 2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为空气气泡可能会堵塞分选柱。

▲ 注：HSA 可用其他蛋白质代替，如牛血清白蛋白（BSA）、胎牛血清（FBS）或人 AB 血清。不建议使用含 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的缓冲液或培养基。

● NK 细胞分选试剂盒，人或 CD56 分选磁珠，人

● 分选柱和分选器：根据标记的细胞数和细胞总数选择合适的分选柱和分选器。

● 培养基：人 NK 培养基，补充 5% AB 血清和 500 IU/mL 人白细胞介素 2 (IL-2)。

● 人白细胞介素-2

● 可选) 细胞扩增袋或带盖平底细胞培养板。

● 加湿培养箱

● 用于装载磁珠粒子的样品混悬仪。

● 可选) 用于流式细胞分析的荧光结合物抗体。

- 可选) 碘化丙啶溶液或 7-AAD 染色溶液, 用于流式细胞仪排除死细胞。

[步骤]

- ▲ 方案中的所有步骤都必须是在无菌条件下进行。

一、抗生物素磁珠粒子的装载

- ▲ 使用前将抗生物素磁珠粒子充分涡旋重悬, 以获得均匀的悬浮液。

- ▲ 抗生物素磁珠粒子不含防腐剂。在无菌条件下取出等分样品。

- ▲ 建议以 1×10^8 个抗生物素磁珠粒子为一批装载抗生物素磁珠粒子。装载的抗生物素磁珠粒子在 2-8 °C 下可稳定保存 2 个月。

1. 移取 100 μ L CD335 (NKp46)-生物素和 100 μ L CD2-生物素到可密封的 2 mL 离心管中, 混匀。

- ▲ 注: 该抗体组合经过优化, 可实现最大的 NK 细胞活化和扩增。

2. 涡旋充分重悬抗生物素磁珠粒子。

3. 取出 500 μ L 抗生物素磁珠粒子 (1×10^8 抗生物素磁珠粒子) 并加入到抗体混合物中。

4. 加入 300 μ L 缓冲液, 使总体积达到 1 mL。

- ▲ 注意: 抗生物素磁珠粒子可以灵活地加入生物素化抗体或配体。如果需要, 可添加适当浓度的其他生物素化抗体或配体, 并用缓冲液相应调整至总体积为 1 mL。

5. 使用样品混悬仪, 以大约 12 转/分钟 (最慢的永久运行程序) 在 2-8 °C 温度下恒定、轻柔地旋转孵育 2 小时。

6. 装载的抗生物素磁珠粒子 (1×10^8 抗生物素磁珠粒子/毫升) 即可使用。不要从抗体混合物中移除装载的抗生物素磁珠粒子。在 2-8 °C 下可保存 2 个月。

二、使用人 NK 细胞分选试剂盒进行 NK 细胞的磁性分离

▲ 根据人 NK 细胞分选试剂盒的说明书分离 NK 细胞。

三、NK 细胞激活、扩增步骤

该 NK 细胞活化方案针对使用 NK 细胞分离试剂盒纯化的 NK 细胞进行了优化，每两个 NK 细胞使用一个装载的抗生物素磁珠粒子（粒子与细胞的比例为 1:2）。

▲ 注：其他应用可能需要每细胞 1:2 以外的负载抗生物素磁珠粒子比例。

▲ 下面给出的活化量最多为 10^6 纯化 NK 细胞或 10^6 PBMCs。当使用更高的细胞数时，应相应增加所有试剂体积和总体积（例如，细胞总数为 2×10^6 时，所有标示试剂体积和总体积的两倍）。

1. 彻底重悬已装载的抗生物素磁珠粒子，并将每 10^6 NK 细胞对应的 5 μL (5×10^5 已装载的抗生物素磁珠粒子) 转移到合适的离心管中。

▲ 注：如果阴性对照实验使用未装载的磁珠粒子，则每 10^6 NK 加入 5×10^5 个未装载的抗生物素磁珠粒子，以取代已装载的抗生物素磁珠粒子。

2. 向已装载的抗生物素磁珠粒子中加入 100 μL 培养液，然后 $300 \times g$ 离心 5 分钟。

3. 吸去上清液，用 50 μL 新鲜培养液重悬已装载的抗生物素磁珠粒子。

4. 以每 950 μL NK 细胞培养基（补充 5% AB 血清和 500 IU/mL 人白细胞介素 2 (IL-2)）含 10^6 个细胞的密度重悬 PBMCs 或纯化的 NK 细胞。

5. 将步骤 3 中制备的抗生物素磁珠粒子加入 950 μL 细胞悬液中，混匀。

6. 将混合物以每毫升 10^6 个细胞的密度加入合适的细胞培养容器中，例如，在 24 孔细胞培养板的孔中。

7. 在 37 °C、5% CO₂ 下培养。

▲ 注：每天检查培养物，必要时添加新鲜培养基。

▲注：NK 细胞扩增需定期添加培养基。下面的指导方针为 NK 细胞的刺激和扩增指南。

8. 第 6 天，用吸管轻轻上下移动细胞悬浮液，打散团块。

9. 测定细胞数，加入新鲜培养基（NK 培养基中添加 5% AB 血清和 500 IU/mL IL-2）稀释至 $1-1.5 \times 10^6$ 细胞/mL。转移到合适大小的新鲜培养容器中。

▲注：NK 细胞扩增依赖于供体。当 NK 细胞的细胞密度维持在每毫升 $1-1.5 \times 10^6$ NK 细胞时，可获得最佳效果。视扩增率而定，可能需要每天对体系进行分割。