

NK细胞扩增试剂盒（新鲜版）(92-02-0001)

[研究背景]

本产品适用于人新鲜外周血或者脐带血来源 NK 细胞的扩增培养，包含 NK 细胞无血清培养基和 NK 细胞激活扩增试剂，经体外激活扩增可获得高活率、高数量、高纯度的 NK 细胞。本试剂盒仅限于体外研究使用。

[试剂盒组成]

NK 细胞无血清培养基

组分	规格	数量	保存条件	有效期
无血清培养基	1L	1 瓶	2-8 °C	见试剂外标签

NK 细胞激活扩增试剂

组分	规格	数量	保存条件	有效期
包被液	30 μ L /支	1 支	-20 °C	见试剂外标签
Day0 添加液	25 μ L /支	1 支	-20 °C	
NK-A	50 μ L /支	1 支	-20 °C	
NK-B	60 μ L /支	1 支	-20 °C	
NK-C	1000 μ L /支	1 支	-20 °C	

[注意事项]

1.血样要求：

- (1) 采集新鲜外周血（脐带血）建议使用肝素钠真空采血管（应避免使用 EDTA 采血管）。
- (2) 建议新鲜血样在 4 h 内进行单核细胞分离，随时间延长，单核细胞分离数量及活性可能下降，影响 NK 细胞的诱导扩增，超过 4 h 建议离心时间延长至 30 min。

2.培养条件:

培养体积少于 500 mL 时, 需折叠培养袋再放置培养。

3.接种密度:

PBMC 建议接种密度在 $2.0-3.0 \times 10^6$ cells/mL, CBMC (红细胞影响, 建议进行红细胞沉降处理) 建议接种密度在 $2.5-4.0 \times 10^6$ cells/mL, 密度过低不利于细胞增殖, 密度过高影响 NK 细胞纯度。

4.补液处理:

(1) 培养基使用: 每次补液前, 将 NK 无血清培养基 37°C 复温, 温度过低易造成细胞出现絮状团, 活率降低。配制补液培养基时, 各激活扩增试剂复溶后需要颠倒混匀。

(2) 补液密度: 灵活掌握补液时机, 调整补液量。补液前细胞密度一般为 $1.5-3.0 \times 10^6$ cells/mL, 补液后密度为 1.0×10^6 cells/mL 左右。当细胞扩增状态不理想时, 可适当推迟补液或补加血浆 (5%-10%), 如果操作人员不确定是否补液, 可联系我司技术人员。

(3) 细胞培养后期, 要控制细胞结团, 细胞密度过高易出现絮状物, 需要拍打细胞培养袋或者对细胞培养瓶进行轻柔的摇晃混匀。

(4) 补液操作: 培养初期 (DAY 0-DAY 5), 一定不要随意晃动瓶子。DAY3 补液时, 将配好的培养基将培养基沿培养瓶侧壁缓缓打出, 动作轻柔, 避免细胞机械性损伤。

5.其他

本产品应在有效期内使用。产品启封后应立即使用或者分装保存, 否则影响产品性能。

试剂盒配备了 1L、2L 和 3L 的不同体系, 用户可根据自己需要进行选择。

[使用方法]

◆ DAY -1 (包被)

取一支 30 μL 包被液, 加入 3 mL DPBS 中混匀, 加入 T25 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 4°C 冰箱平放过夜。如果时间紧急, 也可以 37°C 培养箱孵育 2h。

◆ DAY 0 (单核细胞分离及种瓶)

- 1.供者新鲜抗凝全血 15-20 mL (通常情况下, 1mL 血样可收获 1×10^6 个 PBMC/CBMC), 取少量血样做无菌划线检测, 剩余血样采用淋巴分离液或淋巴分离管进行单核细胞的分离 (详见相应产品的使用说明书)。离心后可见细胞分层, 最下层是红细胞, 最上层是血浆, 中间白膜层即为单核细胞层。
- 2.热灭活自体血浆的制备: 用无菌吸管吸取上层血浆 (不要碰到白膜层) 于离心管中, 56°C 灭活 30min, 置于 4°C 冰箱 20min 冷却静置, 然后 1000g 室温离心 10min, 上清即为热灭活的自体血浆。
- 3.单核细胞分离: 吸取白膜层 (单核细胞层) 于离心管中, 加入 RPMI 1640 培养基或 0.9%生理盐水混匀, 250g 室温下离心 10min, 洗涤 1-2 次。用少量 NK 无血清培养基重悬, 细胞计数后备用。
- 4.根据计数结果, T25 培养瓶中, 用 NK 培养基 (含 10%热灭活的自体血浆) 调整 PBMC 浓度为 $2.0\text{-}3.0 \times 10^6$ cells/mL, 终体积为 5 mL。取一支 25 μL 的 Day0 添加液 加至培养瓶中, 混匀后, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中平放培养。

注: 培养基每次使用前需 37°C 复温。

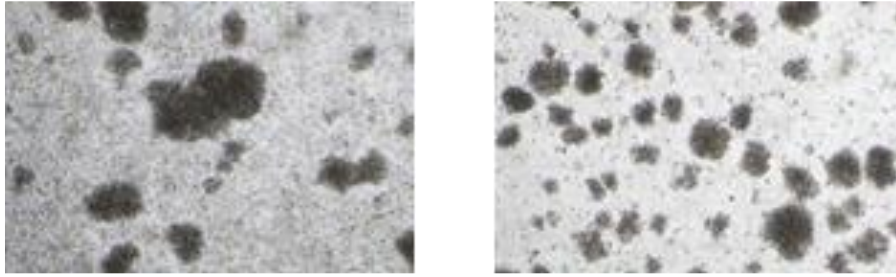
◆ DAY 3 (补液, 关键步骤)

- 1.培养基配制: 取一支 50 μL 的 NK-A 加到 9 mL NK 无血清培养基中, 并加入 1 mL 热灭活的自体血浆混匀 (10%热灭活的自体血浆)。
- 2.将上述配置好的培养基沿培养瓶侧壁, 轻轻补加至培养瓶中, 终体积约 15 mL, 轻柔混匀后放置 37°C , 5% CO_2 培养箱中平放培养。

注: 请勿吹打细胞, 轻轻摇匀即可。

◆ DAY 5 (补液并转瓶)

- 1.镜下观察细胞生长情况, 如图细胞结团 (40 \times) 情况时, 将细胞培养液轻柔吹打 2-3 次混匀后转移至 T75 培养瓶中。



2.补加 30 mL NK 培养基（含 5%热灭活的自体血浆），期间用部分培养基润洗原 T25 培养瓶中残留细胞一并转入新的 T75 培养瓶中。同时补加一支 60 μ L 的 **NK-B**，终体积约 45 mL，轻柔混匀后放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。

◆ DAY 7-13（转袋，计数和补液）

- 1.培养基的配制：取 1 支 1mL 的 **NK-C**，加入培养基瓶内剩余的 NK 无血清培养基中（约 950 mL）。
- 2.轻柔吹打细胞，混匀后取少量细胞悬液计数，将补液后的细胞密度调整为 $1.0-1.2 \times 10^6$ cells/mL 左右，计算补液体积。
- 3.将细胞悬液转移至 T175 或细胞培养袋中，根据计算的补液体积，拍打培养袋使细胞均匀分布，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱中培养。细胞培养袋中液体 < 500mL，需折叠放置。
- 4.DAY13 取样检验（根据需要）：用 5 mL 注射器分别从袋中抽取少量的细胞悬液进行细菌、真菌、内毒素、支原体、细胞表型等检测。

◆ DAY 15-DAY16（收获）

收获细胞，也可根据细胞数量和密度适当补液和延长收获时间。建议收获细胞密度 $2.5-3.0 \times 10^6$ cells/mL。