

## NK细胞扩增试剂盒（冻存版）(92-02-0002)

### [研究背景]

本产品适用于人冻存 PBMC 或 CBMC 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数量、高纯度和高活率的 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 μL /支	1 支	-20 °C	见试剂外标签
Day0 添加液	25 μL /支	1 支	-20 °C	
NK-A	50 μL /支	1 支	-20 °C	
NK-B	60 μL /支	1 支	-20 °C	
NK-C	1000 μL /支	1 支	-20 °C	

### [注意事项]

#### 1. 细胞复苏和接种：

(1) 细胞复苏时间不超过 2min，复苏后加入 10 倍体积的 NK 细胞无血清培养基中，轻轻混匀，离心去除上清液。

- (2) **静息处理**（可选择性操作）：用含有 10% 的冻存自体血浆或血清替代物的无血清培养基重悬 PBMC 或 CBMC，密度为  $3.0-4.0 \times 10^6$  cells/mL，置于培养瓶中，37℃培养箱静息处理 1 h。若静息处理后，细胞出现粘连，可过细胞筛去除粘连。
- (3) **包被**：将包被液加至培养瓶中，轻轻晃动铺满瓶底，4℃冰箱过夜，如时间紧急，也可 37℃孵育 2h。

## 2. 培养和补液：

- (1) 补液前将 NK 无血清培养基 37℃复温，温度过低易造成细胞出现絮状团，活率降低。
- (2) 激活扩增试剂复溶后需要颠倒混匀，使其充分溶解。
- (3) **培养初期 (DAY 0-DAY 5)**：一定不要随意晃动瓶子，尤其是 DAY3 补液时，将配置好的培养基沿培养瓶侧壁缓缓打入，动作轻柔，避免碰到瓶底细胞。
- (4) **细胞计数**：DAY5 开始每次补液前均需要进行细胞计数（少量即可），计数前轻柔吹打。培养期间注意观察和记录细胞生长状态，便于后续结果分析。
- (5) **细胞密度**：灵活掌握补液时机，调整补液量，补液前细胞密度一般为  $1.5-2.5 \times 10^6$  cells/mL，补液后密度为  $1.0-1.2 \times 10^6$  cells/mL。当细胞扩增状态不理想时，可适当推迟补液或补加血浆/血替（5%-10%），如果不确定是否补液，可联系我司技术人员。
- (6) **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，切忌用力吹打，否则易出现絮状物，影响细胞增殖。
- (7) 细胞转移到培养袋后，培养体积少于 500 mL 时，需折叠培养袋再放置培养。

## 3. 其他

- (1) 本产品应在有效期内使用。产品启封后建议立即使用，否则影响产品性能。
- (2) 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  $\mu$ L 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℃冰箱平放过夜。如果时间紧急，也可以 37℃培养箱孵育 2h。

### ◆ DAY 0 (细胞复苏及种瓶)

#### 1. 细胞复苏:

(1) 将水浴锅温度调至 37℃, 取出冻存管快速置于水浴锅内, 晃动冻存管直至细胞融化, 融化过程不超过 2min。

(2) 将解冻的细胞冻存悬液转移至 10 倍体积的 NK 细胞无血清培养基中, 轻轻混匀。室温 1200rpm 离心 5-10 分钟, 去除上清液。

#### 2. 细胞接种:

弃掉 T25 培养瓶中包被液, 加入用 NK 无血清培养基 (含 10%冻存自体血浆或血清替代物) 重悬的复苏细胞, 调整细胞密度为  $3.0-4.0 \times 10^6$  cells/mL, 终体积为 5 mL。取一支 25  $\mu$ L 的 **Day0 添加液** 加至培养瓶中, 混匀后, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中平放培养。

**注: 培养基每次使用前需 37℃复温。**

### ◆ DAY 3 (补液, 关键步骤)

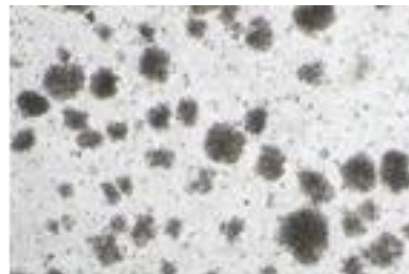
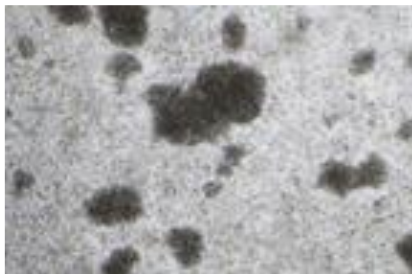
1. 培养基配制: 取一支 50  $\mu$ L 的 **NK-A** 加到 9 mL NK 无血清培养基中, 并加入 1 mL 冻存自体血浆或血清替代物 (含 10%冻存自体血浆或血清替代物)。

2. 将上述配置好的培养基沿 T25 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℃, 5% CO<sub>2</sub> 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)

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 30mLNK 培养基（含 5%冻存自体血浆或血清替代物），期间用部分培养基润洗原 T25 培养瓶中残留细胞并将全部细胞转入新 T75 培养瓶中。同时补加一支 60  $\mu$ L 的 **NK-B**，轻柔混匀后放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。

◆ **DAY 7-DAY 13（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. 根据需要将细胞悬液转移至 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 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 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，可根据细胞数量和密度适当延长收获时间，建议收获细胞密度  $2.5-3.0 \times 10^6$  cells/mL。