

NK 细胞高效扩增试剂盒（91-02-0135-Y）

新鲜脐带血/成人外周血培养方案（2.5L 体系）

[产品介绍]

1. NK 细胞高效扩增试剂盒通用于脐带血及健康人外周血 NK 细胞培养；
2. 组分采用药用级激活抗体组合，化学成分明确，无异源成分，无滋养层细胞；
3. 试剂盒组合仅 3 支试剂，无需包被步骤，无繁杂配制流程及易混淆步骤；
4. 扩增能力强，以单个核细胞为样本，无需前期分选工作；
5. cGMP 标准下，采用一次性生产工艺，保证产品稳定性、一致性。

【试剂材料清单】

► 试剂盒组成

序号	名称	规格	保存温度	货号
1	NK 因子 1	1 支	-20℃至-80℃ 避光保存	91-02-0135-Y-factor
2	NK 因子 2	1 支		
3	NK 因子 3	1 支		
4	NK 细胞培养基	1L * 2 瓶	2-8℃避光保存	91-02-0135-Y-medium
5	NK 细胞培养基（活化）	500ml * 1 瓶	2-8℃避光保存	/

► 配套试剂及耗材

序号	名称	规格	保存温度
1	样本密度分离液（医用级）	100ml	RT
2	NK 细胞培养基（活化）	500ml * 1 瓶	2-8℃避光保存
3	NK 细胞培养基	1L * 2 瓶	2-8℃避光保存
4	PBS	500ml	RT
5	PBMC 高效离心管	50ml * 6 支	RT
6	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	1 个	RT

新鲜脐带血 CBMC 初始投入方案

脐带血中 NK 细胞（CD3- 56+ 16+）占淋巴细胞比例约为 3%-5%之间，其比例远远低于成年人外周血。而 NK 的细胞原始比例是体外培养的关键因素，当 NK 细胞原始比例低于 5%，会显著减缓体外活化及增殖速率。

一般 200ml 规格采血袋内含 28-30ml 抗凝剂，建议采集脐带血量为 100ml 以上（除去抗凝剂体积）。可获得 CBMC 约 2 亿-3 亿之间。

建议客户在实验开始前，将采集的脐带血留出 1ml 进行流式检测，记录 NK 细胞比例（CD3- 56+ 16+）、细胞数量、细胞活率。并参照下表进行初始细胞投入。

样本	NK 细胞 (CD3-56+16+) 占 淋巴细胞比例	细胞活率	投入 CBMC 总量 (单位: 个)	其中 NK 细胞 (CD3-56+16+) 数量 (单位: 个)
新鲜脐带血	3%-5% (或无流式细胞仪)	90%-100%	6000 万及以上	180 万及以上
		80%-90%	8000 万及以上	240 万及以上

新鲜脐血差异影响 NK 细胞体外活化增殖的因素

1. **NK 细胞在新鲜脐带血中的原始比例**：其占比越高增殖及活化效果越好；
2. **细胞活率**：细胞活率越高增殖及活化效果越好；
3. **健康状况**：未用药、无急慢性病产妇其培养效果佳；

长期用药、放化疗或使用过免疫系统类药物的人群培养结果波动性较大。

新鲜成人外周血 PBMC 细胞初始投入方案

由于不同个体外周血原始 NK 细胞数量占淋巴细胞数量比例差异性较大（健康成年人 NK 细胞占淋巴细胞比例约为 5%-15%之间）。推荐采集外周血量为 50-70ml（除去抗凝剂体积）。可获得 PBMC 约 6 千万-1.5 亿之间。

建议客户在实验开始前，将采集的外周血留出 1ml 进行流式检测，记录 NK 细胞比例（CD3- 56+ 16+）、细胞数量、细胞活率。并参照下表进行初始细胞投入。

情况	外周血 NK 细胞占淋巴细胞比例	细胞活率	投入 PBMC 总量(单位:个)	其中 NK 细胞数量 (单位:个)
1	5%-10% (或无流式细胞仪)	90%-100%	9 千万及以上	405 万及以上
		85%-90%	1.5 亿及以上	637 万及以上
2	10%-15%	90%-100%	6 千万及以上	540 万及以上
		85%-90%	7.5 千万及以上	637 万及以上

个体差异影响 NK 细胞体外活化增殖的因素

- 1.NK 细胞在外周血中的原始比例：其占比越高增殖及活化效果越好；
- 2.年龄：健康人在 18-65 岁范围内，年龄越小培养效果越好。大于 65 岁人群其培养结果波动性较大。
- 3.健康状况：未用药、无急慢性病人群其培养效果佳；
长期用药、放化疗或使用过免疫系统类药物的人群培养结果波动性较大。

NK 细胞高效扩增试剂盒活化及培养流程（2.5L 体系）

第一部分 培养基的配制

▷ 活化培养基的配制

1. DAY0 需使用未加入任何因子的基础培养基，请于 DAY0 操作流程完成后配制活化培养基。
2. 本套装包含一瓶 500ml 免疫细胞无血清培养基（活化），加入 1 整支 NK 因子 2 摇匀即为 500ml 活化培养基。使用时现用现配，活化培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。

▷ 增殖培养基的配制

本套装包含两瓶 1L NK 细胞培养基（产品货号：91-02-0135-Y-medium），加入 500ul NK 因子 3 摇匀即为增殖培养基。使用时现用现配，增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶，用完后再配制第二瓶。

1. 第一瓶：1L NK 细胞培养基中加入 500ul NK 因子 3。（剩余 500ul NK 因子 3 加入第二瓶）。
2. 第二瓶：1L NK 细胞培养基中加入剩余 500ul NK 因子 3。

第二部分 脐带血/外周血采集

脐带血

1. 临床获得健康新生儿脐带血 100ml 以上（不含抗凝剂）。（首选肝素钠抗凝剂）
2. 请保证血液在安全无菌且温度为 20-30℃ 条件下平稳运送至实验室。
3. 新鲜脐带血 CBMC 最佳分离时间为取血后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

外周血

- 1.使用一次性负压采血管抽取自体外周血 50-70ml。（首选肝素钠抗凝剂）
- 2.请保证血液在安全无菌且温度为 20-30℃ 条件下平稳运送至实验室。
- 3.新鲜血液 PBMC 最佳分离时间为取血后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

操作释义：

- 1.肝素钠抗凝剂的必要性：由于血浆中的纤维蛋白原活化成有活性的纤维蛋白，纤维蛋白交联成纤维蛋白血凝块，易使 CBMC 形成细胞团块，不利于细胞的活化。肝素钠抗凝剂可减轻上述情况发生几率。
- 2.运输条件需保持常温状态（20℃-30℃），严禁冷藏冷冻运输及长期放置（4 小时以上），尽量平稳送至实验室，减少不必要的摇晃震动。低温、震荡或长期放置会导致红细胞破裂，血液理化性质发生改变，严重影响 CBMC 分离效果及细胞健康状态。

第三部分 NK 细胞的活化及培养流程（2.5L 体系）

第 0 天：

- 1.取出 2-4 支高效离心管，分别加入 16 ml 样本密度分离液，200g 离心 1min，确保离心后隔片下充满分离液，隔片上有 0.5-1cm 高度分离液。小心将 15-25ml 抗凝血缓慢沿管壁加至分离液界面上，确保血液与分离液之间有明显界面（每管可加 15-25ml 血液，若血量超过 25ml，则分管操作）。20-30℃ 环境下，离心力 600g，离心 30min（也可根据实际情况进行调节），注意离心机速度为慢升慢降。
- 2.离心后可观察从上至下分为 4 层，淡黄色血浆层，白色环状 P/CBMC 层，分离液层，红细胞层。用吸管吸取最上层淡黄色血浆（每 50-60ml 抗凝血约可获得 20-25ml 血浆），放置于无菌离心管中做灭活处理。



操作注意：

吸取血浆层时，吸管头请从上至下吸取，吸取至距离白色环状 P/CBMC 约 2mm 处时即可。如过分贴近 P/CBMC 层，可能造成 P/CBMC 的损失。

血浆的灭活步骤：

- ①首先将含血浆的离心管置于水浴锅中 56℃ 静置 30min；
- ②接着放置于-20℃环境下静置 10min；
- ③最后 1200g，离心 15min；
- ④保存离心后的上清至一支新的无菌离心管中，弃去底部沉淀；
- ⑤取出第 0 天所需 10ml 血浆备用；
- ⑥剩余血浆建议在第 3 天补液前进行 3 次-80℃ ~ 37℃ 环境的反复冻融； 3 次冻融后 1200g，离心 15min；弃去底部沉淀，于 4℃ 保存离心后的灭活血浆。（此步骤目的为尽量多的去除血浆中残留的纤维蛋白原，客户可根据自身需求选择性进行。）

3.P/CBMC 洗涤：用吸管吸取 P/CBMC 细胞层至 50ml 离心管中，为尽量获得更多细胞，建议隔片以上部分全部吸取，注意不要吸到红细胞。在 P/CBMC 离心管中加入 PBS 混匀（PBS 与 P/CBMC 体积至少为 1:1，或加入的 PBS 体积大于 P/CBMC 体积），600g，离心 10min。弃去上清，加入 PBS 重悬洗涤，300g，离心 10min。

操作注意：

细胞每一次洗涤都会有相应损失，请客户酌情处理。离心有两种损失，第一种是机械损伤细胞，第二种是离心后上清液中有悬浮细胞。损失量约在 5%-15% 之间，建议第一次洗涤前进行细胞计数，如细胞数量过少，则酌情减少洗涤次数，但至少洗涤 1 次。

4.分离出的 P/CBMC 用**未加入任何因子的基础培养基** 配制成细胞悬液 50ml, 加入一整支“NK 因子 1”, 将上述所有液体转移至 T175 培养瓶中, 加入 10ml **灭活血浆**, 置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂ 培养箱中培养, 期间不要移动培养瓶。

操作注意:

- (1) 建议接种前计数, 记录 P/CBMC 投入数量, 以便后续实验步骤的分析调整;
- (2) P/CBMC 建议接种密度为 $1.5-3 \times 10^6$ 个/ml, 如分离后细胞数少, 则相对应减少培养基的量, 但血浆及活化因子添加量不变;
- (3) 培养期间培养瓶盖需拧松至可透气且不掉落的**状态**, 约 0.5-1 圈 (无论使用的是否为透气瓶, 均拧松瓶盖。)
- (4) 建议使用纯度为 99.99% CO₂ 气体。

第 3 天:

加入 50ml **活化培养基**, 加入 5ml **灭活血浆**。

第 5 天:

加入 100ml **活化培养基**, 加入 5ml (少于 5ml 则**全部加入**) **灭活血浆**。(放入培养箱时, 将培养瓶口垫高, 至液体不会从瓶口溢出并拧松培养瓶盖)

第 7 天: (开始计数)

将培养瓶中贴壁的细胞充分吹打下来, 转移到 1 个细胞培养袋内加入 5ml **灭活血浆** (少于 5ml 则**全部加入**), 视细胞生长状态 (计数), 建议向培养袋补加 300ml **活化培养基**。

第 9 天：

视细胞生长状态（计数），建议向培养袋补加 500ml 增殖培养基，加入剩余灭活血浆。

请客户于培养的第 7 天及后续补液日仔细阅读以下操作释义：

一、NK 细胞培养中判断补液的标准是周期还是浓度：

NK 培养一般来说是按照浓度进行补液，由于个体差异问题，每个样本生长状况不可能 100% 相同，按照天数来补液会有一些不准确，所以按照浓度是相对稳妥的。添加培养基的时间不一定要严格按照后期时间进行，根据具体情况具体分析，确保细胞已经活化成功，呈现聚团生长的情况，细胞数量有增殖。在补加培养基后，脐带血/外周血细胞密度至少维持在 $1-2 \times 10^6$ 个/ml，有利于细胞的生长。

二、关于培养密度及何时补液的问题：

1. 脐带血/外周血 NK 细胞培养的最佳密度为 100 万个/ml~300 万个/ml。

2. 当细胞密度增殖到 200 万-300 万个/ml 之间，根据公式：当前细胞总量（单位个） $\div$ 100 万个 - 现有体积（ml）= 本次需补加培养基体积（ml），将补液后的细胞密度控制在 100-200 万个/ml。一般每隔 48 小时计数补液一次，直到培养基完全用光。

3. 如计数后发现当前细胞密度达不到 200 万个/ml，建议 48 小时后再计数，细胞状态不好或有凋亡现象，立即补加 5ml 灭活人脐带血血浆。

三、关于 NK 细胞在培养过程中的结团问题：

1. 一般情况下，NK 细胞培养期间有结团现象是正常的，由于血浆中有不可避免纤维蛋白存在，容易造成细胞聚团或呈现絮状。经过反复吹打或摇晃可散开呈小团状为正常现象。

2. 使用的脐带血不够新鲜，有肉眼可见或不可见的凝血现象；

- 3.密度过大；
- 4.染菌，细胞死亡，纤维相互交缠；
- 5.未及时补液，细胞缺乏营养，死细胞抱团。

四、为什么我的 NK 细胞长的慢甚至不长？

- 1.NK 细胞占淋巴细胞比例，若低于 5%，细胞呈缓慢生长或停滞增殖状态；
- 2.供血人的身体情况是否健康，无急慢性病，无不良生活习惯，无特殊身体状况；
- 3.血液新鲜度（以外周血/脐带血离体 4 小时为判断，4 小时内为新鲜，4 小时以上为不新鲜）；
- 4.试剂盒、培养液、分离液的保存温度各不相同，请放置在适宜环境下；
- 5.P/CBMC 投入密度需达标，至少为 100-150 万个/ml，推荐为 150 万-300 万个/ml 之间；
- 6.补液时机准确，培养液呈现橘色，且计数达标后进行补液，过早或过多补液都会造成细胞不增殖或者少增殖；
- 7.接种前 3 天，不要移动培养瓶；
- 8.培养环境要稳定，温湿度适宜，CO₂ 气体纯度 99.99%最佳，非必要不反复开关门。
- 9.不论使用的是否为透气培养瓶，都要拧松瓶盖进行气体交换，只依靠透气膜的交换是远远不够的。

第 11 天：

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基** 500ml。

第 13 天：



视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基** 500ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

第 15 天：

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基** 500ml。

第 17 天：

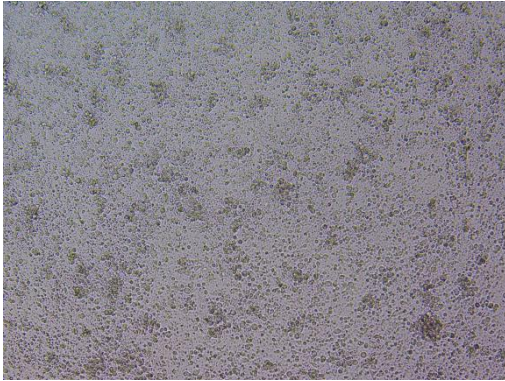
收集NK细胞悬液2500ml, 400g×10min 离心后弃去上清液, 250ml 离心管集2管每管生理盐水200ml 洗涤（1500rpm×8min）1次, 再用50ml 离心管生理盐水100ml 洗涤（400g×10min）1次, 按照200ml 生理盐水+8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞, 封装好后送至使用部门, 同时留样封存以备日后检测。

【注意事项】

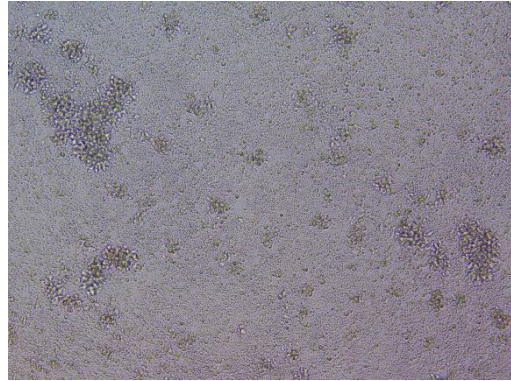
- 1.使用前请仔细阅读本试剂盒说明书，并严格按照说明书执行操作。
- 2.本试剂盒必须按规定温度保存，不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻，并充分混匀，不可剧烈震荡。
- 3.可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。

NK 细胞增殖各周期-细胞形态

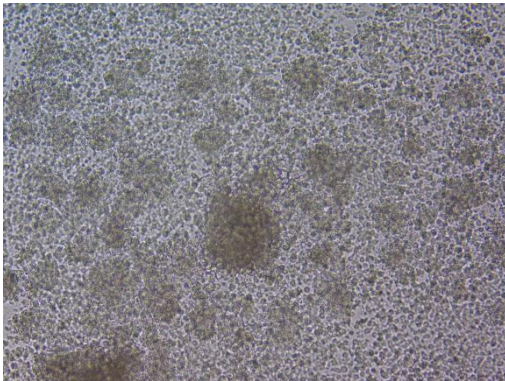
DAY0



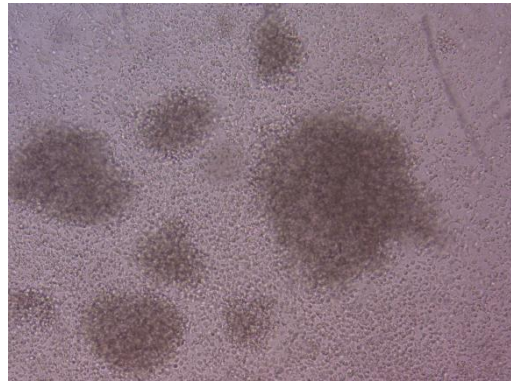
DAY3



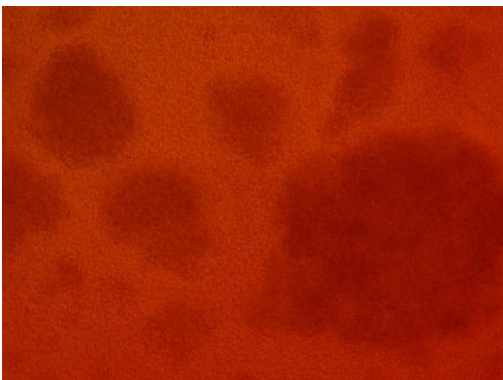
DAY7



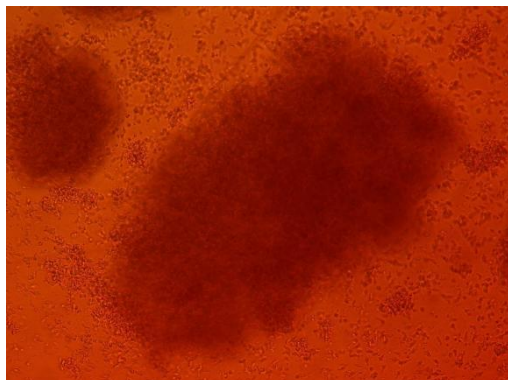
DAY9



DAY12

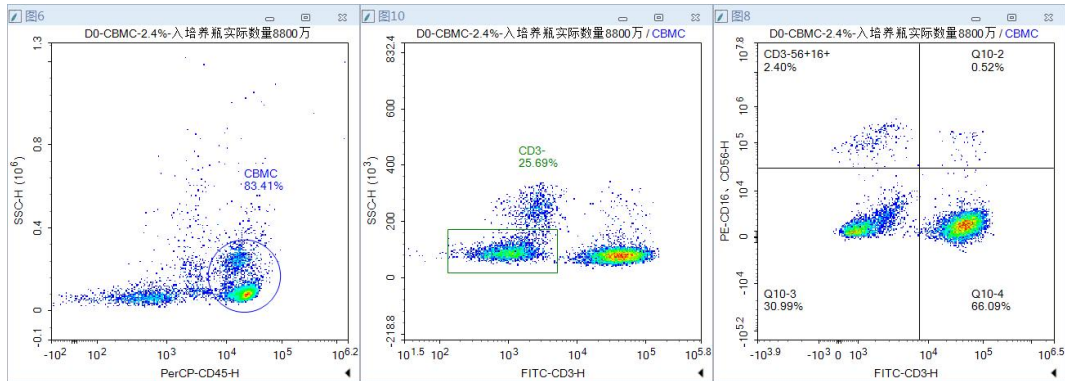


DAY15

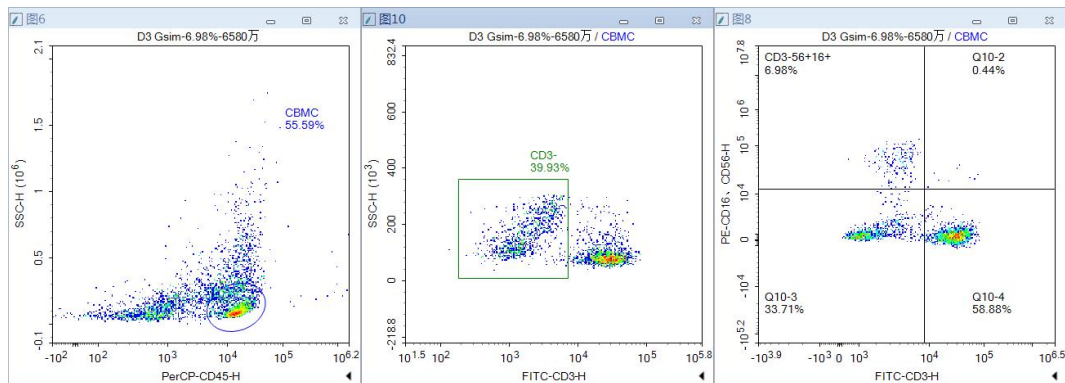


NK 细胞增殖各周期-流式表型

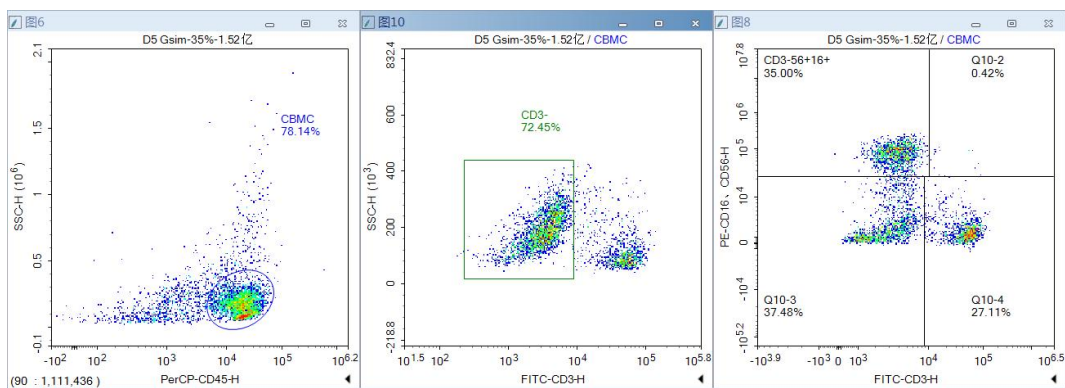
DAY0-脐带血 CBMC-2.40%-8800 万



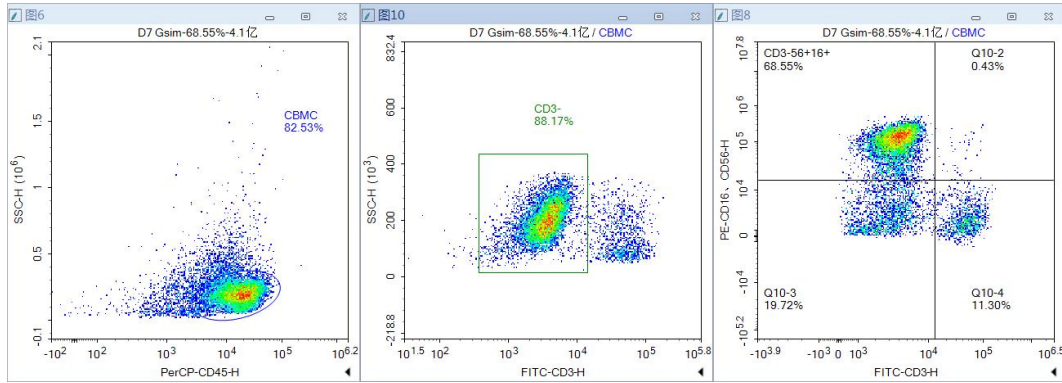
DAY3-脐带血 CBMC-6.98%-6580 万



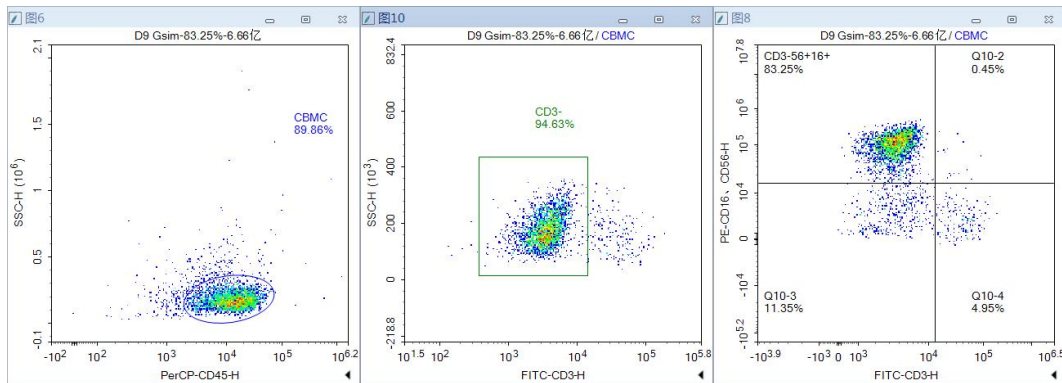
DAY5-脐带血 CBMC-35.00%-1.52 亿



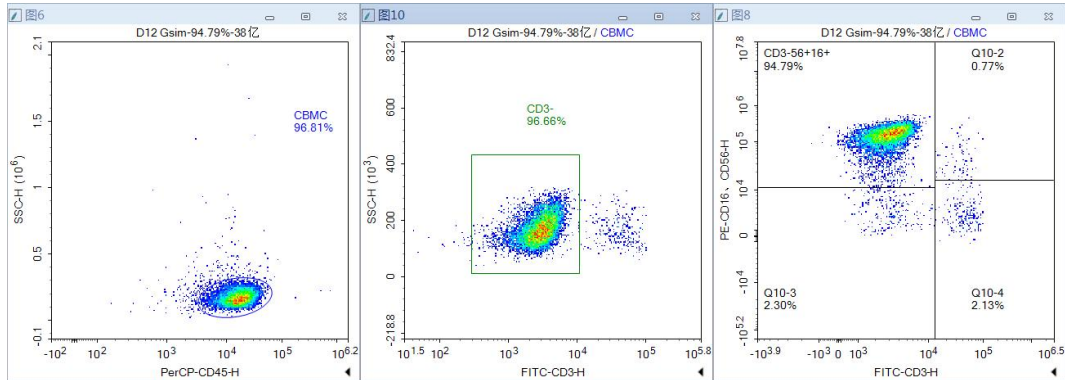
DAY7-脐带血 CBMC-68.55%-4.1 亿



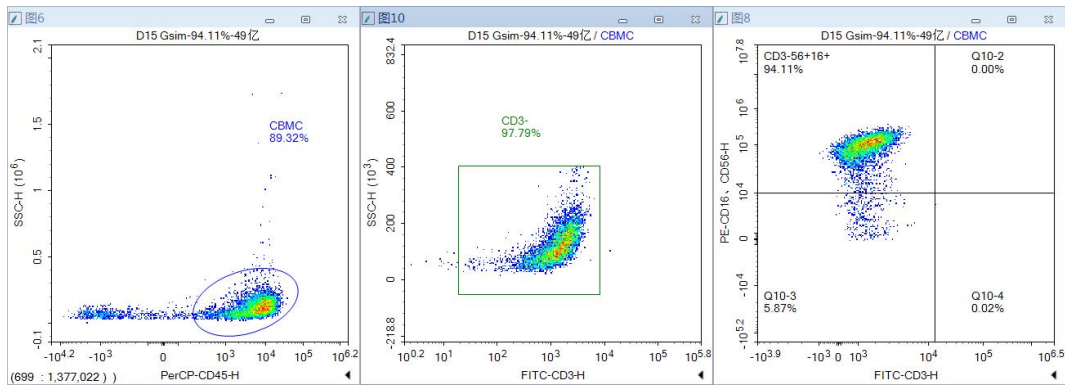
DAY9-脐带血 CBMC-83.25%-6.66 亿



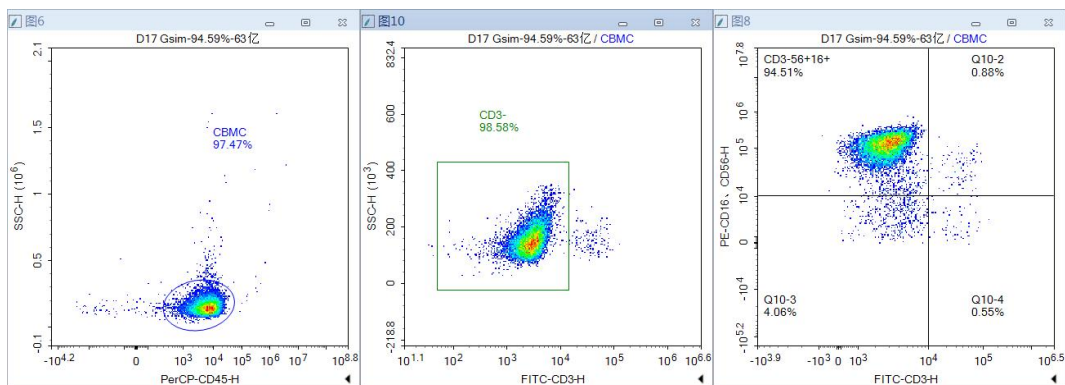
DAY12-脐带血 CBMC-94.79%-38 亿



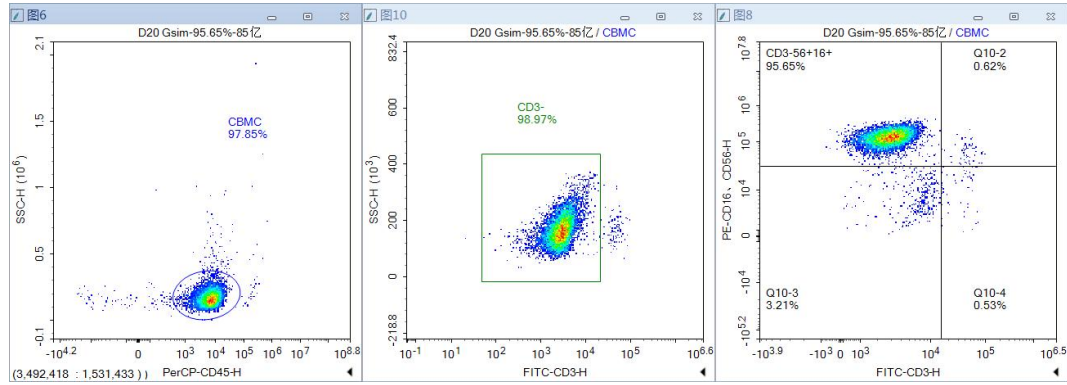
DAY15-脐带血 CBMC-94.11%-49 亿 (扩培至 3L 体系)



DAY17-脐带血 CBMC-94.59%-63 亿 (3L 体系)



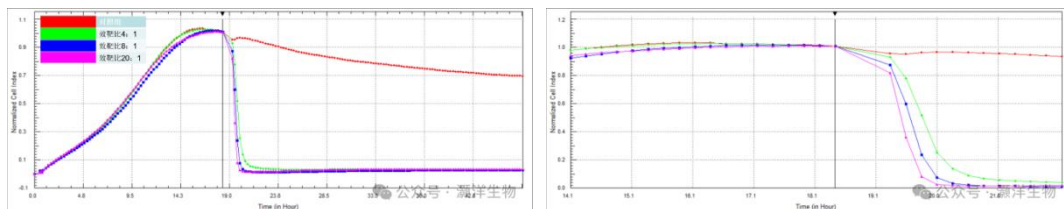
DAY20-脐带血 CBMC-95.65%-85 亿 (3L 体系)



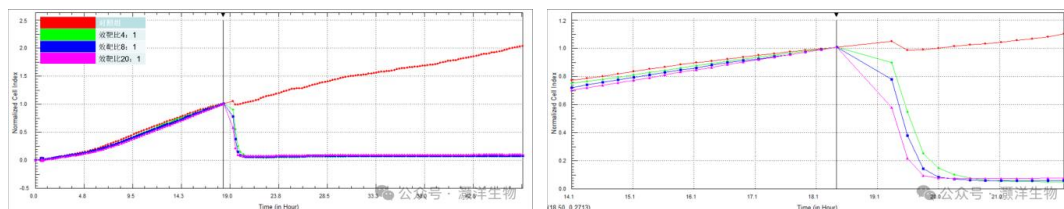
NK 细胞肿瘤杀伤效果——实时无标记动态细胞分析技术（RTCA）

实时无标记动态细胞分析技术（RTCA, Real Time Cellular Analysis）可以检测贴壁细胞的电极阻抗，从而获得细胞变化的参数，包括细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁等。通过 RTCA 实时无标记细胞分析技术，NK 细胞在效靶比为 4: 1、8: 1、20: 1 时，均对各类人源肿瘤细胞起到了非常好的杀伤效果。

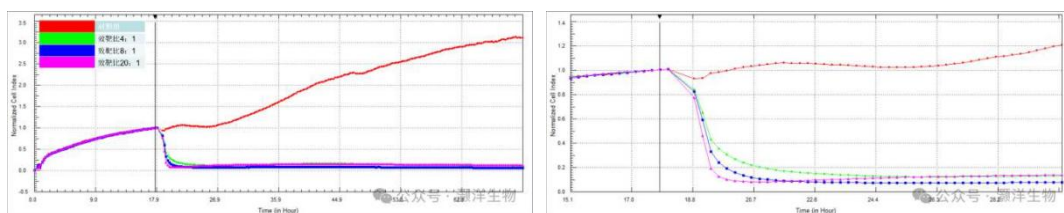
人肝母细胞瘤细胞 HuH-6



人结直肠腺癌上皮细胞 DLD-1



人非小细胞肺癌细胞 NCI-H2030



人宫颈癌细胞 C-33A

