

超级NK细胞无血清培养试剂套装（6L）产品说明书

【产品信息】

序号	名称	货号	规格	保存条件
1	试剂 I	S1045-KIT	1 支	-20℃至-80℃ 避光保存
2	试剂 II		1 支	
3	试剂 III		III-1 至 III-5 共 5 支，混 合使用	
4	试剂 IV		1 支	
5	试剂 V		6 支	
6	试剂 VI		1 支	
7	试剂 VII		1 支	
8	试剂 IX		3 支	
9	活化培养基添加物		1 支	
10	样本密度分离液（医用级）		200ml	RT
11	PBS		500ml	RT
12	免疫细胞培养基		1L * 6瓶	2-8℃避光保存
13	PBMC高效离心管		50ml*5支	RT
14	3L体系悬浮细胞培养袋		2个	RT

【产品介绍】

NK2013-S 细胞活化扩增试剂盒套装（6L 体系）是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清、无异源动物成分的扩增培养试剂盒，产品性能高，质量稳定，适用血液类型范围广。超级 NK 细胞培养方案将血液中内源性的 CD34+ 细胞诱导转化为 NK 细胞，且可抑制 T 细胞的增

殖，因此本款细胞因子试剂盒培养后 NK 纯度（CD3-CD16+CD56+）更高，新鲜脐带血、外周血来源培养后 NK 纯度稳定在 95%以上，冻存细胞培养后 NK 纯度稳定在 85%以上。

【产品用途】

1. 本产品适用于新鲜提取的抗凝外周血或抗凝脐带血 NK 细胞体外扩增。
2. 本产品适用于冻存后 PBMC 的 NK 细胞体外扩增。
3. 当细胞培养起始量为 9×10^7 个 PBMC 时（约 100ml 抗外周凝血或抗凝脐带血），NK 细胞可扩增培养体系至 6-8L。

【使用方法】

一、试剂配制

1. 培养瓶包被液：18ml PBS加入本试剂盒1支试剂 I、1支试剂 II。
2. 增殖培养基：每1000ml免疫细胞无血清培养基中加入本试剂盒1支试剂 V。
3. 活化培养基的配制：配制完增殖培养基后，取出500ml增殖培养基，加入本试剂盒1支试剂 IV、1支活化培养基添加物。

二、取材

取材时使用一次性负压采血管抽取自体外周血 50ml。（建议使用枸橼酸钠或肝素抗凝剂）或临床获得健康新生儿脐带血。（建议使用枸橼酸钠或肝素抗凝剂）。

三、NK细胞的培养

1. 培养前：T175 培养瓶中加入包被液，2-8℃冰箱过夜，或置于 37℃培养箱中至少包被 2h。
2. 第0天：取出2支高效离心管，分别加入15ml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25ml抗凝血缓慢沿管壁加至分离液界面上，确保血液及分离液之间有明显界面（每管可加15-25ml血液，若超过25ml，则分管）。600g，离心30min（也可根据实际情况进行调节），注意慢升慢降。
3. 离心后可观察从上至下分为4层，淡黄色血浆层，白色环状PBMC层，分离液层，红细胞层。用吸管吸取血浆层，做灭活处理。

灭活步骤：置于水浴锅中56℃，30min；然后-20℃静置10min；最后800g，离心15min，保留上清弃去沉淀，短期保存于4℃备用，长期保存请置于-20℃~-80℃环境下。

4. 用吸管吸取 PBMC 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 PBMC 离心管中加入 PBS 混匀（PBS 量要多于吸取的 PBMC 体积），600g，离心 10min。弃去上清，加入 PBS 复溶洗涤，300g，离心 10min。
5. 分离出的 PBMC 用未加任何因子的免疫细胞无血清培养基配制成细胞悬液 40ml，加入 1 整套试剂Ⅲ（5 支全部加入），加入 1 支试剂Ⅸ。将上述所有液体加入到弃掉包被液的培养瓶中，加入 8ml 自体血浆，置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂ 培养箱中培养。（注：建议接种密度为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml，如分离后细胞数少，则相对应减少培养基及血浆使用量，但是活化因子添加量不变。）
注意：先使用完所有活化培养基，再使用增殖培养基。由于个体差异问题，每个样本生长速度不一致，添加培养基的时间不一定要严格按照以下时间进行，需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，细胞密度维持在 1×10^6 个/ml，有利于细胞的生长。
6. 第 3 天加入 40ml NK 活化培养基，加入 5ml 血浆，加入 1 支试剂Ⅸ，1 支试剂Ⅵ。
7. 第 5 天加入 70ml NK 活化培养基，加入 5ml 血浆，加入 1 支试剂Ⅸ，1 支试剂Ⅶ。
8. 第 7 天将培养瓶中细胞完全吹打下来，轻轻摇匀瓶内培养液，无菌取出 0.5ml-1ml 细胞液计数，视细胞生长状态及细胞密度，建议加入剩余自体血浆并补加剩余的活化培养基。转移到 1 个培养袋。
9. 第 9 天：轻轻摇匀袋内培养液，无菌取出 0.5ml-1ml 细胞液计数，视细胞生长状态及细胞密度，建议培养袋补加增殖培养基 500ml。
10. 第 11-12 天轻轻摇匀袋内培养液，无菌取出 0.5ml-1ml 细胞液计数，视细胞生长状态及细胞密度，建议培养袋补加增殖培养基 1000ml。（细胞总量达到 20 亿时进行此项操作）
11. 第 13-15 天轻轻摇匀袋内培养液，无菌取出 0.5ml-1ml 细胞液计数，细胞总量达到 30 亿时，建议培养袋补加增殖培养基 1000ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

- 12.第15-18天轻轻摇匀袋内培养液，无菌取出0.5ml-1ml 细胞液计数，细胞总量达到60 亿时，将1500ml培养液转移至一个新的3L培养袋中，建议每个培养袋补加增殖培养基1500 ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 13.第18-21天，收集NK细胞悬液6000ml，1500rpm×5min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（1200rpm×5min）1次，按照100ml生理盐水+8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞，封装好后备用，同时留样封存以备日后检测。

注：分批收获细胞：扩袋培养时，可收获一部分的细胞，剩余的部分继续补加增殖培养基进行扩增（原则为按照细胞密度补液），客户可按照方案分批收集或一次性收集。

【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。

【保存条件】

根据说明书内容，有效期12个月。