

## NK细胞无血清培养套装（滋养层细胞）产品说明书

### 【产品信息】

序号	名称	货号	规格	保存条件
1	免疫细胞无血清培养基	S103-KIT	2000ml	2-8°C
2	试剂 A1		1ml	-20°C至-80°C避光保存
3	试剂A2		4ml	-20°C至-80°C避光保存

### 【产品介绍】

NK 细胞无血清培养套装（滋养层细胞）是一款专为 NK 细胞培养而设计的体外扩增培养试剂盒，用于 NK 含滋养层细胞的体外扩增培养，套装组分包括免疫细胞无血清基础培养基、试剂 A1、试剂 A2。适用于新鲜提取的抗凝外周血或抗凝脐带血 NK 细胞及冻存后 PBMC 中 NK 细胞的体外扩增。

### 【产品用途】

适用于新鲜提取的抗凝外周血或抗凝脐带血 NK 细胞及冻存后 PBMC 的 NK 细胞体外扩增。

### 【使用方法】

1. 第 0 天，灭活血浆制备：采集的血样需要在 8 小时内分离；将抗凝血液样本 2000rpm 离心 10min，取上层血浆移到新的离心管，56°C 条件下灭活 30min，冷却至室温，2500rpm 离心 10min，用移液管将上清液采集至新的离心管，加入葡萄糖酸钙，使其终浓度为 8%，保存在冰箱中，直到使用前取出。
2. 制备 PBMC，应用不同淋巴细胞分离液可根据相关说明书操作。
3. 培养基的配制：免疫细胞无血清培养基加入重组人 IL-2 使终浓度为 200IU/ml；
4. 将试剂 A1 置于 37°C 快速融化复苏，复苏时间不宜过长，然后用生理盐水清洗一次，1400rpm 离心 5 分钟之后再用 10ml 免疫细胞无血清培养基重悬，加入到 T75 培养瓶中；
5. 将制备好的 PBMC 取  $2 \times 10^7$  cells 加入 20ml 免疫细胞无血清培养基，再加入 1.5ml 灭活的自体血浆，加入到含有试剂 A1 的 T75 培养瓶中混合，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。
6. 第 3 天将培养瓶中的细胞液转移到 50ml 离心管中，1400rpm 离心 5min；

7. 吸弃上清液，收集细胞，添加 30ml 培养基重悬，并添加 1.5ml 自体灭活血浆，转移回原培养瓶中，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。
8. 第 4-6 天，每天观察细胞，根据细胞悬液颜色或细胞密度（细胞浓度为 0.8-1×10<sup>6</sup>/ml）添加培养基，每次添加体积不宜超过现有体积一倍。加液时按 4%、3%、2% 的自体血浆加入 NK 细胞培养液。当培养液体积大于 60mL 则转移至 T225 瓶中培养，置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。
9. 第 7 天将培养的 NK 细胞轻轻吹匀，进行细胞计数，将 NK 细胞转移到细胞培养袋中，加培养基使 NK 细胞浓度在 0.8-1.0×10<sup>6</sup>cells/ml，血浆按 1% 添加。添加试剂 A2 (37°C 复苏，然后用生理盐水清洗一次，1400rpm 离心 5 分钟之后再用 20ml NK 细胞无血清培养基重悬后加入到细胞培养袋中)，置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养；
10. 第 8-11 天每天观察或计数，根据培养液颜色变化或细胞浓度添加培养液，血浆按 1% 添加使得细胞浓度在 1×10<sup>6</sup>cells/ml（随着培养时间推移，细胞浓度可适量增加）。
11. 当细胞生长至所需数量时即可进行收集使用或冻存。一般情况下，12-13 天收集细胞最佳。

### 【注意事项】

- 1、血液采集建议使用肝素钠抗凝管或枸橼酸钠采血袋。
- 2、自体血浆会影响细胞的培养状态，建议自体血浆预留量为 30mL 左右。溶血、高脂肪可能会影响 NK 细胞的扩增。
- 3、本试剂仅限用于以获得自然杀伤细胞为目的的体外诱导处理，不同批次的试剂组分不能互换使用。
- 4、如果试剂外包装管出现裂缝，应立即停止使用。
- 5、应严格按照贮存要求贮存。
- 6、操作过程应在无菌环境下进行。必须保证操作过程中使用的所有容器及所有直接接触细胞液的器具严格无菌。
- 7、本试剂开封后必须一次性使用完毕，不得反复冻融。
- 8、为保证本试剂活性，应严格按照常规细胞冷冻和复苏的要求进行操作。细胞复苏过程中严禁直接将冻存管全部浸没在水浴内，建议至少应保证管盖在水浴液面以上。
- 9、细胞培养过程中，培养前 7 天出现细胞成团属于正常现象，操作过程请注意不要破坏细胞团。

### 【保存条件】



储存温度根据说明书内容，有效期 12 个月。

**【声明】**

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。

