

NK 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

NK Cell Robust Expansion Kit

(货号: 661070)

1. 产品介绍

- 1.1 本产品是一款 NK 细胞高效扩增的试剂盒。外周血/脐带血中的 PBMC 细胞经本试剂盒处理后，在 14-16 天时间内，细胞总数可达到 $6 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ ，细胞存活率 90%以上，扩增倍数在 500-1000 倍，NK 细胞比例最高可达 90%以上；
- 1.2 本试剂盒适用于人外周血/脐带血和经过血细胞单采仪处理获得的白细胞等来源的样品；
- 1.3 本试剂盒是在符合相关规范的无菌环境中生产，并已通过了严格的细菌、真菌、支原体、病毒（HIV、HAV、HBV、HCV）、内毒素检测。本试剂盒不含血浆、动物源成分以及其它不明确成份。

2. 材料和设备

2.1 试剂盒套装组成

套装内容	数量	单位	保存条件	产品性状
NK Cell Culture Medium(661071)	2	瓶	2-8℃	液体
NK-A (661072)	1	支	-20℃	液体
NK-B (661073)	1	支	-20℃	液体
NK-C (661074)	1	支	-20℃	液体
NK-D (661075)	1	支	-20℃	液体
NK-E (661076)	2	支	-20℃	冻干粉

2.2 用户需要自行准备的试剂耗材

0.4% 萘酚蓝溶液、生理盐水、人淋巴细胞分离液、肝素钠（锂）采血管或 100ML 采血袋、PBS、75cm² 悬浮培养瓶、175cm² 培养瓶、细胞培养袋、15mL/50mL/250mL 离心管、移液管、5mL 和 50mL 无菌注射器等。

3. 样本采集及运输要求

3.1 外周血样本采集应为肝素钠采血管，脐带血优先选择 100ml 采血袋，采集过程应严格规范无菌。实际采血总量应大于 50ml，采集后血液与抗凝剂应及时混匀；

3.2 样本运输条件为 18-25℃，24 小时处理样本。

4. T75 培养瓶包被

4.1 在 T-75CM2 悬浮培养瓶中加入 8ml 生理盐水和 1 支 NK-A；

4.2 轻轻摇晃培养瓶，让混合液在培养瓶表面均匀分布；

4.3 在 37℃ 下，放置 120-150min，应避光；

4.4 用 10ml 移液管取出混合液，取出后立即使用，不可冲刷晃动培养瓶包被面。

5. PBMC 的分离和血浆制备（以 50ml 样本 THERMO ST16 离心机为例）

5.1 将 50ml 血液样本均分至 2 个 50ml 离心管，3000rpm, 10min，取上层血浆转移至新的离心管，56℃，30min 灭活，4℃ 静置 10min，3000rpm, 10min，用吸管将上清液转移至新的离心管中，-20℃ 保存，使用前取出；剩下细胞加入生理盐水至原体积，充分混合均匀，转移至 2 个装有 15ml 淋巴细胞分离液的 50ml；

5.2 离心管中，室温下 1800rpm, 30min；取出 PBMC 至新的 50ml 离心管；加入生理盐水至 45ml，1600rpm, 8min；

5.3 去上清，加入生理盐水至 45ml，充分混匀，取样计数；

5.4 1400rpm, 10min 收集 PBMC。

6. 培养基使用说明

每瓶培养基 {NK Cell Culture Medium (661071)} 加入一支 NK-E (661076)，混匀，使用前恢复至室温。

7. 细胞接种

7.1 取包被瓶，去包被液待用；

7.2 取 45ml 培养基（已添加 NK-E），加入一支 NK-B 和 5ml 自体血浆混匀；

7.3 用混匀后的培养基重悬已经收集好的单个核细胞；细胞密度应大于 1.5×10^6 cell/ml；

8. 补液

8.1 D3, 镜下观察有较多克隆团出现, 即可补液, 如有大量较大的克隆团, 可适当打散 (下同), 转移细胞至 T175 培养瓶中, 补加 45ml 培养基 (含 NK-E), 一支 NK-C 和 5ml 自体血浆混匀;

8.2 D5, 补加 110ml 培养基 (含 NK-E), 加入一支 NK-D 和 5ml 自体血浆, 混匀;

8.3 D7, 补加 200ml 培养基 (含 NK-E) 和 10ml 自体血浆, 混匀, 转入细胞培养袋;

8.4 D9, 往细胞培养袋补加 400ml 培养基 (含 NK-E) 和 剩余自体血浆, 混匀;

8.5 D11, 往细胞培养袋补加 800ml 培养基 (含 NK-E);

8.6 D13, 往细胞培养袋补加 400ml 培养基 (含 NK-E);

9. 收获

D14 收获 NK 细胞, 可根据实验情况, 适当提前或延迟。