

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/CBMC 细胞经本试剂盒处理后，在 14-16 天时间内，2L 体系细胞总数可达到 6×10^9 - 8×10^9 ，细胞存活率 90%以上，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)	1	支	-20℃	冻干粉
NK-F (661077)	1	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、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 75cm² 悬浮培养瓶中加入 8ml 生理盐水和 1 支 NK-A，用电动移液器吹打充分混匀；

4.2 让混合液在培养瓶表面均匀分布；

4.3 在 37℃ 二氧化碳培养箱中水平放置 120-150min；

4.4 小心取出混合液，包被后的培养瓶应立即使用，不可剧烈晃动。

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 进行离心，用吸管将上清液转移至新的离心管中，-20℃ 分装保存，使用前取出；

5.2 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 离心管中，室温下 1800rpm，30min；

5.3 取出 PBMC/CBMC 至新的 50ml 离心管；加入生理盐水至 45ml，1600rpm，8min；

5.4 去上清，加入生理盐水至 45ml，充分混匀，取样计数；

5.5 1400rpm，10min 收集 PBMC/CBMC。

6. 完全培养基使用说明：

6.1 第一瓶培养基 {NK Cell Culture Medium (661071)} 加入一支 NK-E (661076)，充分混匀，配置成完全培养基，使用前恢复至室温；

6.2 第二瓶培养基 {NK Cell Culture Medium (661071)} 加入一支 NK-F (661077)，充分混匀，配置

成完全培养基，使用前恢复至室温；

6.3 按顺序配置使用。

7. 细胞接种

7.1 取包被瓶，去包被液待用；

7.2 取 45ml 完全培养基，加入一支 NK-B 和 5ml 自体血浆混匀；

7.3 用混匀后的完全培养基重悬已经收集好的单个核细胞；调整细胞密度 $1.5-2.0 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ；（如初始细胞总数较少，按比例降低接种细胞体积，初始细胞总数不超过 $1 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ ）

7.4 D0（指接种当天）转移混匀后的细胞悬液至包被瓶，转移过程中不可快速冲刷 T-75 培养瓶处理面，应从侧面缓慢加入后，再缓慢平放于培养箱中培养。

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 完全培养基，一支 NK-C 和 5ml 自体血浆混匀；

8.2 D5，补加 110ml 完全培养基，加入一支 NK-D 和 10ml 自体血浆，混匀；

8.3 D7，补加 200ml 完全培养基和 10ml 自体血浆，混匀，转入细胞培养袋；

8.4 D9，分袋，先将培养袋中细胞取一半均分到新的细胞培养袋中，然后将 400ml 完全培养基和 10ml 自体血浆，混匀，均分到 2 个培养袋中；自体血浆如用完可不添加或用细胞营养添加物替代（下同）；

8.5 D11，往细胞培养袋中分别补加 300ml 完全培养基和 5ml 自体血浆，混匀；

8.6 D13，往细胞培养袋中分别补加 300ml 完全培养基 5ml 自体血浆，混匀；

8.7 如需扩大培养体系（如 3L、4L、6L、8L），使用 NK-F 因子配置的完全培养基继续补液培养即可；

8.8 整体根据细胞密度适当补液，补液后细胞密度不低于 $1.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 。

9. 收获

收获 NK 细胞，可根据实验情况，适当提前或延迟。

注意事项：

1、整个补液过程中，每次接种或补液体积因样本、增值速度、初始细胞总数等会发生变化，应维持补液后密度不低于 $1.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ；出现较多较大细胞团可适当打散，说明书 7 中的补液流程可根据实际细胞状况做调整。

2、分袋时间：根据试验的便利性，培养袋里面液体总体积达到 1000-1500ml 时分袋也可以，不局限于 8.4 中提到的 D9 天的分袋时间。

3、细胞培养袋中总体积在 1500-1600ml 能最大发挥培养基效果，不宜过满，当总体积过大还需要继续补液培养时应及时分袋培养。