

NK 试剂盒套装说明书

产品名称:

通用名称: NK 试剂盒套装

试剂盒套装英文名称: NK Cell Culture Kit

产品信息:

套装货号: BLB01E0001

套装组成: NK 细胞培养试剂盒

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 试剂 A	BLB01E0001-1A	200 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 B	BLB01E0001-1B	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 C	BLB01E0001-1C	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 D	BLB01E0001-1D	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

NK 无血清培养基 (货号: BLB01F0008)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 无血清培养基	BLB01F0008	1000mL	2 瓶	2~8 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

产品描述:

本产品适用于自体外周血或脐血 PBMC, 经体外活化扩增获得纯度较高的 NK 细胞。仅限体外研究使用。

使用说明:

步骤	培养时间	使用试剂	培养容器	完全培养基	灭活血浆	总体积	备注
包被	-1 天	NK 试剂 A	175cm ² 培养瓶	/	/	/	包被瓶 4 $^{\circ}$ C 平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B	175cm ² 培养瓶	22.5mL	2.5mL	25mL	种瓶密度 2x10 ⁶ 个/mL
培养	3 天 (第 1 次补液)	NK 试剂 C	175cm ² 培养瓶	46.5mL	3.5mL	75mL	请勿吹打细胞, 补加培养基不要碰到瓶底细胞层
	5 天 (第 2 次补液)	NK 试剂 D	175cm ² 培养瓶	约 166.25mL	8.75mL	250mL	
装袋	7 天 (第 3 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	约 350mL	剩余血浆	600mL	也可按密度补液, 补液后密度在 0.6~1x10 ⁶ 个/mL 范围内, 补液后拍打
分袋	9 天 (第 4 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	每袋各加 300mL	/	1200mL	



分袋	11/12 天 (第 5 次补液)	完全 培养基	细胞培养袋	每袋各加 400mL	/	2000mL	培养袋, 使细胞均匀分布
收获	14 天、15 天	/	细胞培养袋	/	/	2000mL	收集细胞

注意事项:

※ 培养基每次使用前需室温静置 1h 以上(禁用相关设备强制快速复温), 后续操作均如此。

※ 灭活血浆以培养体系的 5%~10%计算用量, 如抗凝剂较多, 建议血浆提高到 7%~12%。

NK 试剂盒套装参考操作方法:

包被 细胞活化瓶预处理 (第-1 天)

1 支 NK 试剂 A 和 13mLD-PBS 混匀, 加入 175cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 或 1 支 NK 试剂 A 和 9mL DPBS 混匀, 加入 75cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 4℃冰箱平放过夜。次日种瓶前吸弃包被液。

种瓶 外周血 PBMC 分离与诱导 (第 0 天)

1. **分离血浆。**取少量血样 (约 300μL) 划线或滴入平皿进行检菌。室温下离心 15 分钟, 取离心上清作为血浆。
2. **血浆灭活。**上层血浆 56℃灭活半小时, 置于 4℃冰箱半小时, 取出在室温下离心 10 分钟, 取上清备用。
3. **分离 PBMC。**等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀, 加到 Ficoll 层上使分层保持清晰, 室温下离心 25 分钟。
4. **洗涤细胞。**吸取 PBMC 层, 加生理盐水吹打混匀, 室温下离心 5 分钟 (脐血建议 8 分钟)。再次洗涤细胞。
5. **细胞计数。**弃上清, 用少量完全培养基重悬细胞, 吸取少量细胞计数。调整细胞密度 1-1.5×10⁶ 个/mL。
6. **种瓶。**吸弃包被液, 将细胞悬液中加入 NK 试剂 B, 灭活血浆 2.5mL, 转入培养瓶内, 培养终体积约 25mL。剩余血浆 4℃密封保存备用。

注意: * 完全培养基的配置: 每瓶培养基加入 1 支 IL-2, 终浓度为 1000IU/mL。

* 包被瓶从冰箱取出的时间约为细胞加入前的 10min。

培养 第一次补液 (第 3 天)

1. 显微镜下观察细胞, 确定是否可以补液。①瓶底贴壁的克隆团达到瓶底面积的 30%以上。②颜色与初始培养液比偏黄。(如无法判断, 可推迟一天补液。)
2. 补液操作。加入 NK 试剂 C 和 3.5mL 灭活血浆, 再加入约 46.5mL 完全培养基, 培养终体积为 75mL。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

第二次补液 (第 5 天)

加入 NK 试剂 D, 和 8.75mL 灭活血浆, 再加入约 166.25mL 完全培养基, 培养终体积定容到 250mL。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

* 第 5 天开始细胞增殖较明显, 中大团变多且分裂相形态细胞居多。

装袋 第三次补液 (第 7 天)



把剩余血浆加入培养瓶，再将培养瓶中的细胞悬液转入细胞培养袋中，随后补液（约 350mL 完全培养基，也可按密度补液，补液后密度在 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 范围内），培养终体积定容到 600mL。

注意：* 装袋前，轻微拍打培养瓶底部细胞，如克隆团太大可进行吹打，注意吹打的力度避免将克隆团吹成单个细胞。

* 装袋后，需定期对培养袋进行拍打，使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

分袋 第四次补液（第 9 天）

1. 配置另一瓶 NK 完全培养基。
2. 将培养袋中的细胞悬液分出一半加入新的培养袋，随后每袋再补入 300mL 完全培养基。（培养终体积为 1200mL）

第五次补液（第 11/12 天）

将剩余的约 800mL 完全培养基均分到 2 个培养袋中，每袋终体积约 1000mL。

检验（第 13 天）

用 2mL 注射器分别从袋内抽取少量细胞悬液进行细菌、内毒素、支原体检测。

收获（第 14/15 天）

正常情况下，第 14、15 天各收获 1000mL 细胞悬液。若因实验需要，可相应提前或延迟收获时间。

如需获得更多培养体积，可延长 NK 培养时间（可延长培养至 21 天，需额外采购 NK 无血清培养基及 IL-2），继续补加 NK 完全培养基，补液后密度不低于 1×10^6 个/mL。

注意事项：

1. **培养瓶的使用：**建议使用悬浮培养瓶或非 TC 处理培养瓶。

2. 血样要求：

①外周血 PBMC $> 3 \times 10^7$ cells（推荐采血量 50mL 左右，用肝素钠真空采血管），建议采血后 4 小时内操作，建议做淋巴细胞亚群分析。不建议使用冻存的外周血。

②脐带血（不含抗凝剂）推荐采血量 > 50 mL，建议把采血袋中抗凝剂抽出至少一半（大约 14mL），其他容器建议抗凝剂不超过 14%（或 PBMC $> 3 \times 10^7$ cells），采血后 12 小时内操作。

注：* 不含抗凝剂的 50mL 脐带血所能提取的单个核细胞量一般为 $5 \sim 8 \times 10^7$ 左右。以此作为参考。

3. 种瓶密度：

PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 2×10^6 个/mL，脐血可适当提高初始铺瓶细胞密度。

4. 补液密度：

补液前密度一般在 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL；补液后密度一般在 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL，不可低于 0.6×10^6 个/mL。

5. 培养基的使用：

- ① 每次补液前需要将培养基在室温下自然复温。
- ② 禁止将整瓶培养基放入 37°C 孵箱复温，否则会加速补液培养基中细胞因子的失活。
- ③ 配置好的扩增培养基（含 IL-2）时效较短，超过一周不建议使用，尤其是活化前期（前 7 天）。

6. **正确处理 and 保存血浆：**具体见说明书。离心后的血浆要确保澄清，添加血浆时需考虑抗凝剂对血浆的稀释作用。



7. **培养袋的使用**: 培养体积小于 1L 的时候, 需要折叠培养袋再进行放置。建议使用我司推荐型号。
8. **灵活掌握补液时机**: 细胞扩增状态不理想时, 可推迟补液时间, 但是尽量不要调整补液的体积尤其注意第一次补液的时机。装袋后的补液体积可根据培养时间的情况进行调整。
9. **控制细胞结团**: 细胞装袋前, 需要根据克隆团的情况充分拍散细胞。装袋后也需每天对袋子进行拍打, 揉搓肉眼观察较大的细胞团。
10. **包被时间**: A 因子包被后需 4°C 平放过夜。(紧急情况下可尝试 37°C 包被 2 小时)
11. **培养初期不要随意晃动培养瓶**: 否则活化的克隆团容易飘起来, 而降低包被因子对细胞团的活化。
12. **因子的使用**: 为减少因子挂壁的损失, 建议使用进行离心处理, 将含因子的西林瓶放入 50mL 离心管中, 1000rpm 离心 1-2min。
13. **设备保养**: 定期检查 CO₂ 培养箱温度、浓度并及时更换滤网。定期保养和清洁生物安全柜。
14. **环境监测**: 定期更换初效、中效、高效过滤器, 保证洁净区环境标准。
15. **固定实验耗材种类和型号**: 需提前评估变更型号、规格对培养效果的影响, 如 175cm² 的培养瓶, 细胞培养袋等。

生产企业的名称:

碳基生命科技(广州)有限公司

地址:

广东省广州市番禺区钟村街汉兴东路 10 号 1601

联系方式:

020-31557420

说明书编制:

核准日期: 2024 年 07 月 18 日

核准日期: 2024 年 09 月 26 日

核准日期: 2025 年 04 月 03 日

