

NK 试剂盒套装说明书

产品名称

通用名称：NK 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	200μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 B	BLB01E0001-1B	500μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 C	BLB01E0001-1C	500μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 D	BLB01E0001-1D	500μL	1 支	-20℃	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℃	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℃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2×10 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 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 范围内，补液后拍打培养袋 使细胞均匀分布
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	
	11/12 天 (第5 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	每袋各加 400mL	/	2000mL	
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 13mL D-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 D-PBS 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 2×10^6 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）

3.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 5mL 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.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。

2.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。

3.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。

4.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）。

5.正确处理和保存血浆：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。

6.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。

7.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。

8.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。

9.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）

10.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。

11.设备保养：定期检查 CO_2 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。

12.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。

13.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 175cm^2 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