

SperiClone™ CD Human NK Cell Expansion Medium

斯博利康 SperiClone™ CD 人 NK 细胞扩增培养基

产品说明书

一、产品描述

SperiClone™ CD Human NK Cell Expansion Medium 是一款专为人自然杀伤细胞（Natural Killer Cells, NK cells）体外激活、维持和扩增设计的 GMP 级培养基体系。该体系由 NK 细胞激活扩增基础培养基及多种阶段性补料组成，可支持外周血 PBMC 或脐血单个核细胞来源 NK 细胞的体外培养、激活与扩增。本产品**不含血清及异源动物源成分**，可降低异源来源成分引入风险，提高培养体系批间一致性，并减少血清未知成分对 NK 细胞状态和功能稳定性的影响。

二、产品组分与储存

该产品以完整套装形式出售（1 Kit）。

目录号	产品名称	规格	储存条件
SperiClone™ CD Human NK Cell Expansion Medium (货号: SP05402) (长按 Ctrl 同时点击产品名称, 可直接跳转官网产品页)			
SP05402-1000	NK 细胞激活扩增基础培养基	1000 mL×2	2~8℃
SP05402-A	补料 A	250 µL	≤-20 °C
SP05402-B	补料B	1 mL×2	≤-20 °C
SP05402-C	补料 C	250 µL	≤-20 °C
SP05402-D	补料 D	500 µL	≤-20 °C
SP05402-E	补料 E	500 µL	≤-20 °C
SP05402-F	补料F	500 µL	≤-20 °C



NOTE: 补料解冻后应充分混匀, 并按推荐时间点加入。基础培养基与补料 B 配制成 NK 完全培养基后, 应于 2-8°C 避光保存, 建议 14 天内使用完毕。

三、试剂及材料

试剂	耗材
SperiClone™ CD Human NK Cell Expansion Medium	TC 处理 T75/T175 细胞培养瓶
人外周血淋巴细胞分离液	10 mL/25 mL 移液管
DPBS, 无钙, 无镁	15 mL/50 mL 离心管
细胞清洗液	1.5 mL/2 mL 冻存管
0.2%台盼蓝染色剂	细胞计数板
无菌生理盐水	
淋巴细胞分离液	

四、试剂准备

1. 灭活自体血清的制备

- 血浆收集: 将全血吹打混匀 (每管血样不超过 30 mL), 于 4°C、650×g 离心 10 min (升速 3、降速 3)。使用巴氏吸管吸取上层淡黄色血浆至无菌离心管中。
- 灭活处理: 将收集的血浆封口后, 置于 56°C 水浴锅中恒温灭活 30 min。
- 血清分离与储存: 灭活结束后, 于 4°C、1200×g 离心 10 min (升速 9、降速 7)。收集上层纯净血清, 储存于 4°C 冰箱备用。

● 血液用量参考表格



供体全血淋巴计数 ($10^9/L$)	推荐血液量
<1.5	80mL
1.5~2.0	70mL
2.0~2.5	60mL
2.5~3.0	50mL

2. NK 细胞完全培养基的配制

- (1) 取 1 瓶 NK 细胞激活扩增基础培养基，加入 1 支融化后的补料 B。
- (2) 充分混匀后即为 NK 完全培养基。另一瓶基础培养基对应的补料 B 应在使用前再融化添加。
- (3) 配制后的 NK 完全培养基应于 2-8℃避光保存，建议 14 天内使用完毕。

NOTE：每次补液或使用前，应将所需体积的 NK 完全培养基置于室温完全复温。不建议使用培养箱或水浴锅进行快速复温。

3. 阶段性添加液的准备

使用阶段	时间点	配制方法	用途
接种期添加液	Day 0	5 mL 常温 NK 完全培养基 + 补料 A + 补料 C + 补料 E + 终浓度 5% 灭活自体血清/血浆，充分混匀	支持起始接种和早期激活
扩增期添加液	Day 5	30 mL 常温 NK 完全培养基 + 补料 D + 补料 F + 终浓度 5% 灭活自体血清/血浆，充分混匀	支持扩增期放大培养



五、使用方法

1. 培养流程总览

时间点	主要操作	关键控制点
Day 0	分离 PBMC 或脐血单个核细胞，计数后接种	接种后活细胞密度 $2.0-4.0 \times 10^6$ cells/mL， 培养体积 30 mL
Day 3	缓慢补加 30 mL NK 完全培养基及 5%体积灭活自体血清/血浆	沿瓶壁补液，避免剧烈吹打和过度扰动
Day 5	加入补料 D、补料 F，5%体积灭活自体血清，转入 T175 培养瓶	轻柔混匀，必要时用细胞悬液冲洗 T75 表面，最多 3 次
Day 7	计数，根据细胞状态补液；必要时转入培养袋	根据细胞密度、培养基颜色和细胞状态选择 1:1 或 1:2 补液
Day 9	计数并补液	如有剩余灭活自体血清/血浆，可按方案加入培养体系
Day 11	计数并补液	根据细胞扩增状态调整补液体积，如后续需要继续放大培养可自行添加 IL-2 (100 万 IU) 配置完全培养基。
Day 14-18	收获细胞	根据实验或生产需求进行后续检测与应用
Day 14-18 (可选至 Day 21)	推荐收获细胞；如状态和工艺验证支持，可延长至 Day 21	根据实验或生产需求进行后续检测与应用



2. 以 50 mL 人外周血提取 PBMC 为例，分离 PBMC

- (1) 将收集血浆后的血样，按照 1:1 体积比添加无菌生理盐水，缓慢吹打混匀。
- (2) 按照 1:1 体积比，将稀释后血样缓慢添加至淋巴细胞分离液上层。
- (3) 离心：室温、400~800x g、升速 1、降速 0，25 min。
- (4) 移除上层液体，用无菌巴氏吸管收集白膜层细胞至含无菌生理盐水或 DPBS 的离心管中。

3. PBMC 处理

- (1) 轻柔吹打混匀细胞悬液，室温 400 × g 离心 10 min（升速 9、降速 7）。
- (2) 弃上清，轻弹沉淀，使用无菌生理盐水或 DPBS 清洗并定容至 30 mL。吹打混匀后快速吸取 0.2 mL 细胞悬液进行计数。
- (3) 再次室温 400 × g 离心 10 min（升速 9、降速 7）。完成后弃上清，轻弹沉淀备用。

4. Day0 接种

- (1) 按“四、2”配制 NK 完全培养基。吸取 30 mL NK 完全培养基至 50 mL 离心管，于室温备用；剩余 NK 完全培养基置于 2-8°C 避光保存。
- (2) 接种前，取 5 mL 常温 NK 完全培养基，加入融化后的补料 A、补料 C、补料 E 及终浓度 5% 灭活自体血清/血浆，充分混匀后加入 T75 培养瓶内，并平铺培养表面。
- (3) 将处理好的 PBMC 用 30 mL 常温的完全培养基重悬，轻柔吹打混匀，接种至 T75 培养瓶内。摇晃混匀后放入 CO₂ 培养箱培养。

NOTE：接种后活细胞密度建议为 $2.0-4.0 \times 10^6$ cells/mL，培养体积为 30 mL。如有多余细胞，可按用户内部冻存 SOP 进行冻存。

5. Day 3 补液：沿培养瓶侧壁缓慢补加 30 mL 复温后的新鲜 NK 完全培养基，并加入终浓度 5% 灭活自体血



清/血浆。轻柔摇晃混匀后放回培养箱继续培养。补液过程中避免移液管碰触培养瓶底部，避免剧烈吹打细胞。

6. Day 5 转瓶与扩增期添加

- (1) 吸取 120 mL NK 完全培养基至 50 mL 离心管内，于室温复温；剩余 NK 完全培养基继续置于 2-8°C 避光保存。
- (2) 向复温后的 NK 完全培养基中加入融化后的补料 D、补料 F 及终浓度 5% 灭活自体血清/血浆，充分混匀后加入新的 T175 培养瓶内。
- (3) 轻柔吹打 T75 培养瓶内细胞悬液，并用细胞悬液冲洗 T75 培养瓶表面，最多冲洗 3 次。随后将细胞悬液转移至新的 T175 培养瓶中，轻柔混匀后放回培养箱继续培养。

7. Day 7 补液或转培养袋

充分轻柔混匀后取样计数。根据细胞密度、培养基颜色、细胞团块情况和细胞活率综合判断补液比例，可采用 1:1 或 1:2 补加新鲜 NK 完全培养基。随后加入 5 mL 灭活自体血清/血浆。

本次补液后，如培养体积达到 150-300 mL，可将细胞悬液转入培养袋中培养，培养袋可对折放置。

8. Day 9 补液

充分轻柔混匀后取样计数。根据计数结果、培养基颜色及细胞状态补加新鲜 NK 完全培养基，可采用 1:1 或 1:2 补液。如有剩余灭活自体血清/血浆，可全部加入培养体系内。

9. Day 11 补液

充分轻柔混匀后取样计数，根据细胞数量及状态补加新鲜 NK 完全培养基，继续培养，如后续需要继续放大培养可自行添加 IL-2（100 万 IU）配置完全培养基。

10. Day 14-18 收获（可选延长至 Day 21）

根据实验设计或生产需求收获细胞，收获后可根据用户自身工艺要求进行细胞计数、活率检测、流式表型检测、



无菌检测、支原体检测、内毒素检测、功能检测及其他放行检测。

NOTE:

由于不同供者样本及起始单个核细胞组成差异较大，本说明书不对补液后目标细胞密度作固定限定。建议根据以下因素综合判断补液比例：

- 细胞密度：细胞增长较快或密度较高时，可适当提高补液比例。
- 培养基颜色：培养基明显变黄提示代谢旺盛或营养消耗较快，应及时补加新鲜 NK 完全培养基。
- 细胞状态：若细胞活率下降、碎片增加或细胞团块异常增多，应谨慎增加操作扰动，并结合污染风险、样本质量和培养条件进行排查。
- 培养体积：当培养体积超过 T175 培养瓶适宜体积范围时，可转入培养袋继续培养。

六、扩大培养参考方案

以下方案为扩大培养参考流程。实际操作时，应结合细胞密度、细胞活率、培养基颜色、细胞团块情况及培养容器工作体积进行调整。

天数	培养载体	数量	血清 (mL)	添加完全培养基 (mL)	培养基总量 (mL)	备注
0	细胞培养瓶 T75	1	3	27	30	PBMC 接种 ($2.0-4.0 \times 10^6$ cells/mL)
3	细胞培养瓶 T75	1	3	27	60	沿瓶壁缓慢补液，避免剧烈扰动
5	细胞培养瓶 T75	2	6	114	180	细胞悬液均分至两个培养瓶中
7	培养袋 A-1000N	2	剩余	360	540	根据细胞状态转入培养袋



9	培养袋 A-1000N	2	-	540	1080	-
14	培养袋 A-1000N	2	-	按需补加至约 1000 mL/Bag	2000	-
可到 21	-	-	-	-	-	推荐 Day 14-18 收获; 可根据工 艺延长至 Day 21

NOTE: 为使更多细胞转入培养袋中, 可先将 T75 培养瓶中的细胞轻柔吹打混匀并全部转入培养袋; 再用部分新鲜配制的培养液润洗培养瓶表面, 并再次转入培养袋, 最后补齐培养基体积。

七、相关产品推荐

推荐试剂&材料	品牌	货号
<u>SperiClone™ CD Human NK Cell Expansion Medium</u>	SPERIKON	SP05402
<u>人外周血淋巴细胞分离液</u>	SPERIKON	SP00910
<u>DPBS</u>	SPERIKON	SP00121
<u>红细胞裂解液</u>	SPERIKON	SP00952

NOTE: 如需更多产品信息、技术支持或订购信息, 请联系 SPERIKON。

八、免责声明与客户服务

法律声明: 本产品生产设施符合 ISO 9001 与 ISO 13485 质量管理体系标准, 并按 GMP 级产品相关要求进行生产和质量管理。使用单位应根据自身用途建立完整的生产、质控、放行和临床应用管理体系。本公司不对任何违反产品说明书、机构 SOP、监管要求或非正常使用本产品所导致的结果承担责任。如需更多信息或购买相关产品, 请联系 SPERIKON。

