

NK细胞培养试剂盒套装

产品名称	目录号	产品规格	储存条件	保质期
NK 细胞培养试剂盒套装	SP05403	1Kit	/	/

1 产品说明:

产品为NK 细胞基础培养基套装 (NK Cell Expansion Medium Kit) , 是专用于NK 细胞激活扩增培养的高效增殖培养基, 可搭配斯博利康 NK 细胞基础培养基补料配置为完全培养基使用。

NK 细胞基础培养基+补料配置为NK细胞完全培养基是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清、无异源动物源成分的 NK 细胞维持和扩增培养基。和传统的含血清培养基相比, 无血清培养基的设计大大降低在NK 细胞培养过程中引入异源物质的风险, 提高培养基批次间的一致性, 并且避免血清中的不明确成分可能导致的NK细胞过度激活以及活性降低。

2 产品组成:

组成	规格	储存条件	保质期
NK 细胞培养基	1000mL*2	2-8°C, 避光保存	18
补料 A	200uL	-20°C	18
补料 B	500uL	-20°C	18
补料 C	500uL	-20°C	18
补料 D	500uL	-20°C	18
补料 E	13ml	常温	24
补料 F	2 支	2-8°C	24

3 操作方法:

包被

细胞活化瓶预处理 (第-1 天) 1 支 NK 试剂 A 和 13 mL试剂E 混匀, 加入到 175cm² 培养瓶 (非 TC 处理) 中, 平放晃匀铺满, 或 1 支 NK 试剂 A-2.0 和 9 mL 试剂E 混匀, 加入 75cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 4°C 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 300 μ L) 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°C灭活半小时, 置于 4°C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。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 $1-1.5 \times 10^6$ 个/mL。

6. 种瓶：吸弃包被液，将细胞悬液中加入 NK 试剂 B-2.0，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 试剂F (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-2.0 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-2.0 ，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 $0.6-1 \times 10^6$ 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。



4 注意事项:

1. 血样要求:

①外周血 PBMC $>2.5\times 10^7$ 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. 种瓶密度: PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 $1-1.5\times 10^6$ 个/mL, 样本状态差可适当提高铺瓶密度至 2×10^6 个/mL。

3. 补液密度: 补液前密度一般在 $1.5-2\times 10^6$ 个/mL; 补液后密度一般在 $0.6-1\times 10^6$ 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, 建议一周左右使用完, 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。

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。

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. 因子的使用: 为减少因子挂壁的损失, 建议使用前进行离心处理, 将含因子的西林瓶放入 50mL 离心管中, 1000rpm 离心 1-2min。

12. 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。

13. 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。

14. 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。

免责声明: 本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

