

NK 细胞培养试剂盒套装

产品说明书

一、产品描述

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。

二、产品组成

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	/	/

套装成分：

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



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 175 cm² 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 75 cm² 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 2.5 mL, 转入培养瓶内, 培养终体积约 25 mL。剩余血浆 4°C 密封保存备用。

NOTE: 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 1000 IU/mL。包被瓶从冰箱取出的时间约为细胞加入前的 10 分钟。

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 3.5 mL 灭活血浆, 再加入约 46.5 mL 完全培养基, 培养终体积为 75 mL。

NOTE: 请勿吹打细胞!!!



第二次补液（第 5 天）

加入 NK 试剂 D-2.0，和 8.75 mL 灭活血浆，再加入约 166.25 mL 完全培养基，培养终体积定容到 250 mL。

NOTE：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 350 mL 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 600 mL。

NOTE：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 300 mL 完全培养基。（培养终体积为 1200 mL）

第五次补液（第 11/12 天）

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

检验（第 13 天）

用 2 mL 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 1000 mL 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。

四、注意和声明：

1. 血样要求：

外周血 PBMC $> 2.5 \times 10^7$ cells（推荐采血量 50 mL 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 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 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 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 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℃ 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 and 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 1 L 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℃ 平放过夜。（紧急情况下可尝试 37℃ 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 50 mL 离心管中，1000 rpm 离心 1-2 min。

12.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。

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 175 cm² 的培养瓶，细胞培养袋等。

五、免责声明与客户服务

本产品应按照产品说明书所载明的适用范围、操作方法及储存条件使用。由于不同实验体系、样本来源及操作条件可能存在差异，用户在使用前应结合自身实验目的对产品适用性进行评估与验证。对于未按说明书要求使用、超出产品适用范围使用，或因操作条件变更而导致的实验结果差异或相关影响，本公司不承担相应责任。如需技术支持或更多产品信息，请联系 SPERIKON。

