

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: BLB01E0005

套装组成: NK 细胞培养试剂盒-A/D (货号: BLB01E0005-1A/D)

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 激活添加剂 1	BLB01E0005-1C	1000 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 激活添加剂 2	BLB01E0005-1D	100 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

NK 细胞培养试剂盒-E/G (货号: BLB01E0005-1E/G)

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 扩增添加剂 1	BLB01E0005-1E	1000 μ L	2 支	2~8 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 扩增添加剂 2	BLB01E0005-1G	50 μ g	1 支	2~8 $^{\circ}$ C	干粉	18 个月
重组人 IL-2 蛋白 (高效型)	C02A-0001	1x10 ⁶ IU	2 支	2~8 $^{\circ}$ C	干粉	18 个月

NK 激活培养基 (货号: BLB01E0005-2)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 激活培养基	BLB01E0005-2	100mL	1 瓶	2~8 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

NK 扩增培养基 (货号: BLB01E0005-3)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 扩增培养基	BLB01E0005-3	1000mL	2 瓶	2~8 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

产品描述:

本产品适用于新鲜或冻存脐血 CBMC, 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	灭活血浆或 HPL	总体积	备注
包被	-1 天	NK 试剂 A	75cm ² 培养瓶	/	/	/	包被瓶 4°C 平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	25mL	种瓶密度 1x10 ⁶ 个/mL
培养	3 天 (第 1 次补液)	NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	50mL	请勿吹打细胞, 补加培养基不要碰到瓶底细胞层
	6 天 (第 2 次补液)	NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	75mL	
换瓶	7 天 (第 3 次补液)	NK 完全激活培养基 NK 完全扩增培养基	175cm ² 培养瓶	71.25mL	3.75mL	150mL	按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1: 1
装袋	9 天 (第 4 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	142.5mL	7.5mL	300mL	补加 NK 细胞完全培养基 (根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测), 并加入 5%自体血浆(或 5%HPL)。
	11 天 (第 5 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	285mL	15mL	600mL	
	13 天 (第 6 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	600mL	剩余血浆或 5%HPL	1200mL	
分袋	15 天 (第 7 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	900mL	/	2100mL	
收获	17/18 天	/	细胞培养袋	/	/	2100mL	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。
- ※ 脐血量超 80mL 添加自体血浆, 若血量低于 80mL 用 HPL 替代自体血浆。
- ※ 完全激活培养基的配置: 每瓶 NK 激活培养基加入 1 支 NK 激活添加剂 1 和 1 支 NK 激活添加剂 2。
- ※ 完全扩增培养基的配置: 每瓶 NK 激活培养基加入 1 支 NK 激活添加剂 1、25ng/mL 的 NK 扩增添加剂 2 和 1 支重组人 IL-2 蛋白, IL-2 终浓度为 1000IU/mL。

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 9mL D-PBS 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 脐血 CBMC 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 $^{\circ}$ C 灭活半小时, 置于 4 $^{\circ}$ 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 CBMC。**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 CBMC 层, 加生理盐水吹打混匀, 室温下离心 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 1×10^6 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 1.25mL, 转入培养瓶内, 培养终体积约 25mL。剩余血浆 4 $^{\circ}$ C 密封保存备用。

注意: * 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. **补液操作。**显微镜下观察细胞, 按 25mL/瓶补加 NK 细胞完全激活培养基, 并加入 5%自体血浆 (或 5%HPL)。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

第二次补液 (第 6 天)

2. **补液操作。**显微镜下观察细胞, 细胞增殖较明显, 中大团变多, 按 25mL/瓶补加 NK 细胞完全激活培养基, 并加入 5%HPL(5%自体血浆), 培养终体积为 75mL。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

换瓶 第三次补液 (第 7 天)

3. **补液换瓶操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基, 将细胞悬液从 T75 瓶转移至 T175 瓶, 按 75mL/瓶补加 NK 细胞完全扩增培养基 (激活培养基使用完后补加扩增培养基), 并加入 5%HPL (5%自体血浆), 培养终体积为 150mL。

装袋 第四次补液 (第 9 天)

4. **补液操作。**培养瓶中的细胞悬液转入细胞培养袋中, 按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基, 补加 150mLNK 细胞完全扩增培养基, 5%HPL (5%自体血浆), 补液后终体积 300mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测, 补液后密度不低于 1×10^6 /mL。

第五次补液 (第 11 天)

5. **补液操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基, 补加 300mLNK 细胞完全扩增培养基, 并加入 5%HPL (5%自体血浆), 补液后终体积 600mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测, 补液后密度不低于 1×10^6 /mL。

第六次补液 (第 13 天)

6. **补液操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基, 补加 600mLNK 细胞完全扩增培养基,



补液后终体积 1200mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 1×10^6 /mL。

分袋 第七次补液 (第 15 天)

7. 分袋补液操作。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 450mL 完全培养基。培养终体积 2100mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 1×10^6 /mL。

收获 (第 17/18 天)

正常情况下，第 17、18 天各收获 1050mL 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 扩增培养基及 NK 细胞培养试剂盒，继续补加 NK 完全扩增培养基，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. 样本要求：

① 脐血（含抗凝剂）采血量 < 80mL 或期望 NK 收获量更多，建议使用 HPL 替代自体血浆，HPL 培养细胞扩增倍数比自体血浆高约 1-2 倍。

② 采血后 12 小时内完成操作。

③ 冻存样本建议冻存密度 $2-4 \times 10^7$ 个/mL，复苏后活率不低于 80%，脐血样本培养过程中使用 HPL 替代自体血浆。外周血样本（抗凝剂肝素钠）建议使用自体血浆，也可用 HPL 替代自体血浆。

2. **种瓶密度：**铺瓶的起始细胞密度建议 1×10^6 个/mL，红细胞较多时计数选择荧光计数或红细胞裂解后计数，以免影响细胞铺瓶密度。

3. **补液密度：**补液后密度不可低于 1×10^6 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 配置好的完全培养基时效较短，建议一周左右使用完。

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。建议使用我司推荐型号。

7. **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）

8. **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。

9. **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。

10. **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。

11. **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。

12. **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 75cm² 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12月09日

核准日期: 2025年01月10日

核准日期: 2025年04月03日

