

NK 细胞培养试剂盒 (2L 体系)

说明书

名 称	NK 细胞培养试剂盒 (2L 体系)
英 文	NK cell culture kit
货 号	ZQ-NK2L
规 格	基础 1000mL*2, 因子 1mL*4
保 存	2-8°C/-20°C避光保存 12 个月
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

NK 细胞培养试剂盒包括了激活、诱导和扩增需要的细胞因子和必要的培养基、培养添加物。本产品可刺激通过 Ficoll 分离获得并经过冻存的单个核细胞诱导分化为自然杀伤细胞 (NK 细胞)。

【组成】

组分货号	试剂名称	规格	储存条件	数量
ZQNK-0	NK Cell Culture Medium	1000mL	2-8°C	2 瓶
ZQNK-1	NK Cell Grower 1	1mL	-20°C	1 支
ZQNK-2	NK Cell Grower 2	1mL	-20°C	1 支
ZQNK-3	NK Cell Grower 3	1mL	-20°C	1 支
ZQNK-4	NK Cell Grower 4	1mL	-20°C	1 支

【使用说明】

为了能获得稳定可靠的结果, 请严格按照以下所述步骤进行操作, 并使用我们推荐的实验耗材及试剂。本试剂盒包含四种刺激组分(NK Cell Grower1~4), 每管体积为 1ml, 建议每管组分拿出静置后再加入到培养基中, 并用培养基润洗管子, 以确保每管所有组分都能加入到培养基中。**请认真阅读说明书配置每种扩增液!**

实验材料:

NK Cell Culture Medium (1000mL) *2;

NK Cell Grower 1(1 ml);

NK Cell Grower 2(1 ml);

NK Cell Grower 3(1 ml);

NK Cell Grower 4(1 ml);

悬浮细胞专用细胞培养瓶(T75、T175)(透气盖培养瓶, 推荐康宁品牌);

悬浮细胞专用培养袋;

淋巴细胞分离液;

无菌生理盐水或 PBS;

【操作规程】

所有的工作必须在无菌室中进行, 请严格遵守无菌操作规范, 使用无菌耗材。

1、培养瓶包被

- (1) 在 T-75 cm² 悬浮培养瓶中, 加入 8 ml PBS 和 1ml NK Cell Grower 1;
- (2) 轻轻摇晃, 使溶液在培养瓶瓶底扩散, 铺满瓶底;
- (3) 37°C培养箱静置 2 h 或在 4°C静置过夜;
- (4) 移除包被溶液, 用 15 ml PBS 润洗瓶底 1 次(请勿吹打瓶底), 洗过的培养瓶要立即使用。

2、血液分离

- (1) 采集 40 ml 外周血于抗凝管(务必用肝素抗凝管), 800g, 15 min 室温离心;
- (2) 自体血浆制备: 取上清血浆, 置于水浴锅中 56°C, 灭活 30 min 后 1100g, 15 min 室温离心, 用移液管将上清转移至新的 15ml 管内, 4°C保存备用;
- (3) 取上述离心后下部细胞成分, 加 PBS 至 40 ml, 混匀, 加到 2 个装有 2ml 医疗级人淋巴细胞分离液的 5ml 离心管中, 室温下, 500g 离心 30 min, 慢升慢降(加速度 2, 减速度 0);
- (4) 离心后, 血液被分为 4 层, 由血浆(上层)、血浆和分离液之间的单个核细胞(第 2 层)、分离液(第 3 层)和红细胞层(底层)构成。

3、制备 PBMC

- (1) 用吸管将第 2 层单个核细胞收集至新的离心管;
- (2) 加入 40 ml PBS 洗涤细胞悬液, 300g 离心 8 min;

(3) 弃去上清液，再加入 40 ml PBS 洗涤细胞悬液，300g 离心 8 min。

(4) 弃去上清液，加入 20 ml NK Cell Culture Medium 稀释细胞悬液，混匀，

取 100 μ l 悬液细胞计数，余下悬液 300g 离心 8 min。

注意：整套试剂可激活 $4-6 \times 10^7$ PBMC，多余细胞可以弃去。

4、NK 细胞扩增

(1) Day0，配置 **NK 细胞扩增液 A**：将全部的 NK Cell Grower 2 加入到 25 ml NK Cell Culture Medium 中，**同时加入 2.5 ml 灭活后的自体血浆**。用该扩增液重悬将上述细胞到 $2-2.5 \times 10^6$ /ml(**根据收获的 PBMC 细胞数来决定重悬密度，确保重悬密度在该范围内，有利于 NK 细胞激活**)；

(2) 在已包被的 T75 培养瓶中，加入以上细胞悬浮液(以 20~25ml 最合适)，请沿培养瓶侧壁加入细胞，动作需轻柔，请勿直接吹打培养瓶底；

(3) 5% CO₂、37°C 培养 3 天(在此期间请勿移动细胞，整个培养以静置为主)；

(4) Day3，配置 **NK 细胞扩增液 B**：将全部的 NK Cell Grower 3 加入到 460 ml NK Cell Culture Medium 中。用移液管轻轻吹打 T75 培养瓶中的细胞，将细胞悬液全部转入 T175 培养瓶内，加入 40 ml **NK 细胞扩增液 B(剩余扩增液 B 放 2-8°C 保存)**，**同时补加 4 ml 灭活后的自体血浆**；

(5) Day5，用移液管轻轻吹打细胞，取细胞进行计数，加入约 80 ml **NK 细胞扩增液 B** 于 T175 培养瓶内，**同时补加 4 ml 灭活后的自体血浆**，使细胞密度保持在 1×10^6 /ml 左右；

(6) Day7，用移液管轻轻吹打细胞，将细胞悬液平均转入两个培养袋内，加入剩余的 **NK 细胞扩增液 B 和剩余的灭活自体血浆(每个培养袋等量加入)**；

(7) Day9，配置 **NK 细胞扩增液 C**：将全部的 NK Cell Grower 4 加入到剩余的 1500 ml NK Cell Culture Medium 中。视细胞生长密度，每个培养袋补加 350-450 ml **NK 细胞扩增液 C(使补液后细胞密度保持在 0.8×10^6 /ml 左右)**(**剩余扩增液 C 放 2-8°C 保存**)；

(8) Day11，向每个培养袋内补加等量剩余的 **NK 细胞扩增液 C**；

(9) Day14，鉴定细胞，同时取样检测真菌、细菌、支原体、内毒素等指标。

所有培养液使用前需先预温，用多少预温多少，避免反复预温对细胞因子活性的影响！

5、细胞收集

- (1) 经过 14 天的培养, 将细胞悬浮液从培养袋, 转入大型的离心瓶, 用离心机以 600g 离心 10 min, 分离细胞和培养基;
- (2) 小心地移去上清液, 用含有 0.1% 人类血清白蛋白的生理盐水(0.1% HSA 生理盐水), 悬浮所有的细胞沉淀物, 收集到一个离心瓶中。重复离心, 清洗细胞 3 次;
- (3) 收集细胞, 用适量含有 1% 人类血清白蛋白的生理盐水重悬细胞, 通过一次性细胞筛(200 目)过滤, 收集并注入含有 1% 人类血清白蛋白的生理盐水回输液中, 总量为 100-200 ml。封装好后送病房, 同时留样封存以备日后检测。

每天补液操作流程

天数	培养瓶或袋	数量	加入培养基 (ml)	加入自体血浆 (ml)
day0	T75	1	扩增液 A 25	2.5
day3	T175	1	扩增液 B 40	4
day5	T175	1	扩增液 B 80	4
day7	培养袋	2	扩增液 B 170/袋	剩余平均全部加入
day9	培养袋	2	扩增液 C 350-450/袋	
day11	培养袋	2	剩余扩增液 C 平均加入	

【注意事项】

- 1、 注意无菌操作, 避免污染;
- 2、 试剂盒请在有效期内使用;
- 3、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
- 4、 仅供科研使用。