

## NK 细胞扩增因子-CB 使用说明书 V2.0

### 试剂盒套装组成

套装组成	货号	试剂名称	规格	数量	储存条件
NK 细胞扩增因子	MDL2004	NK 试剂--包被液	6ml	1	-20℃
		NK 试剂--因子 I	1ml	1	-20℃
		培养基补充剂（无动物源成分）适用脐血 NK 培养	40ml	1	-20℃

### 产品描述

本产品中 NK 试剂-包被液和 NK 试剂-因子 I 含有多种细胞因子，可用于脐带血来源的冻存或新鲜分离单个核细胞中 NK 细胞的高效扩增。本试剂盒在无血清培养基条件下进行 NK 细胞的体外扩增，培养两周左右 NK 细胞纯度（CD3<sup>+</sup>CD<sub>(16+56)</sub><sup>+</sup> 细胞）在 30-80%之间，扩增倍数（相对于起始细胞数量）可达 100-200 倍。

### 试剂使用

- 1、NK 试剂-包被液和 NK 试剂-因子 I 使用前需 4℃ 或者室温融解；
- 2、NK 培养基配制:GT-T551H3 培养基+终浓度 500u/ml IL-2,此培养基用于整个 NK 细胞培养过程；
- 3、可用培养基补充剂代替脐血自体血浆；
- 4、每次补液前需要将培养基恢复至室温；
- 5、配制好的培养基中含有 IL-2，溶解的 IL-2 有时效性，超过两周需要重新补加。

### 操作方法：

- 1、Day -1 培养瓶抗体包被
  - (1) 在 T-75cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中加入 6ml NK 试剂-包被液；
  - (2) 轻轻晃匀，使液体均匀铺满瓶底，用封口膜封好培养瓶通气孔；
  - (3) 将加入包被液的瓶子 4℃ 平放过夜；
  - (4) 使用前从 4℃ 冰箱取出，吸除包被液，用 PBS 洗瓶底一次（轻轻晃动即可，避免吹打），洗过的瓶子要立即使用。
- 2、Day 0，分离单核细胞并计数，培养基将细胞浓度调整到 1×10<sup>6</sup>cells/ml 左右，其中内含 10%培养基补充剂，加入 NK 试剂-因子 I 并混匀，以 30ml 脐血为例，通常单核细胞在 3×10<sup>7</sup>cells 左右，可以将细胞悬液的体积控制在 30ml 左右；然后细胞悬液加入 T75 cm<sup>2</sup> 培养瓶，5%CO<sub>2</sub>，37°培养；
- 3、Day 4，补加细胞培养基至 90-150ml，并添加 5%培养基补充剂；
- 4、Day 5，补加培养基至 270-450ml，并添加 1~3%培养基补充剂；
- 5、Day 7-11，隔天 1~3 添加培养基，并添加 1~3%培养基补充剂；

6、培养至 13-15 天，根据细胞体积和状态，收集细胞。

### 细胞培养操作表格

本表格仅供参考，样本有差异，根据细胞状态补液体积可以适当调整。

操作	培养时间	使用试剂	补加培养基体 积	补加培养基补 充剂体积	总体积	处理方法
包被	Day -1	NK 试剂-包被液	//	//	//	4℃ 包被过夜
接种	Day 0	NK 试剂-因子 I	27	3	30	接种细胞
补液	Day 4	NK 培养基	55.5	4.5	90	细胞生长快，可以在 Day 3 天补液
	Day 6	NK 培养基	每袋约 90ml	8.1	270	装袋，分成两袋，每袋 135ml
	Day 8	NK 培养基	每袋约 270ml	8.1	810	根据细胞浓度和状态，补液体积可有 所调整
	Day 10	NK 培养基	每袋约 400ml	全部加入	1600	
	Day 12	NK 培养基	每袋约 400ml	//	2400	
收获	Day14	NK 培养基	//	//	//	根据需要进行 1-2 次收获

### 注意事项:

- 1、细胞接种浓度：培养过程中，尤其是培养初期，细胞接种浓度应在  $1 \times 10^6$  cells/ml 左右。
- 2、试剂使用量：一套 NK 扩增试剂盒建议使用体积为 30ml，如培养体积大建议增加试剂盒用量。
- 3、包被瓶子选择：选择可以进行贴壁细胞培养的培养瓶，如常用的康宁货号 431464 的 T75 cm<sup>2</sup> 培养瓶。
- 4、包被条件：包被操作需 4℃ 平放过夜，包被后暂时不用，在 4℃ 可放 2-3 天，存放期间确保有液体均匀覆盖培养瓶底；如遇紧急情况可尝试 37℃ 包被 2 小时。
- 5、培养基补充剂使用：培养初期，添加培养基补充剂有利于细胞的快速增殖，建议接种细胞时，添加 10% 的培养基补充剂。
- 6、灵活补液：培养基有明显变色且细胞团数量多，可以提前补液；细胞扩增状态不理想时，可推迟补液；补加培养基时，体积可以根据细胞的数量和状态作相应的调整；培养瓶培养期间如有大的细胞团贴壁可用移液枪吹散，由此形成的絮状沉淀后续培养过程中会消失，不影响整体培养。
- 7、培养袋使用：如果体积较少，将细胞转移到培养袋前，可用磁铁条在培养袋上进行分区培养。
- 8、细胞团控制：装袋后，如有较大的细胞团，需要对袋子进行拍打。
- 9、因子法培养 NK 细胞，因样本差异，NK 比例波动比较大。
- 10、样本差异：因样本差异，NK 比例波动比较大。