

NK 细胞模块化扩增试剂盒说明书

1. 产品名称

通用名称： NK 细胞模块化扩增试剂盒
英文名称： Modular NK Cell Expansion Kit

2. 产品组成

本试剂盒包含针对 NK 细胞扩增不同阶段设计的模块化添加剂。

试剂盒内容		货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 基础培养基			1 L	2 瓶	2~8℃ 避光	液体	18 个月
Tube A	基础添加模块		200 μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
Tube B	初始激活模块		200 μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
Tube C	功能增强模块		500 μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
Tube D1	持续扩增模块		1 mL	1 支	-20℃	液体	18 个月
Tube D2			1 mL	1 支	-20℃	液体	18 个月

3. 产品描述

本产品基于特制的 NK 细胞基础培养体系，采用独特的模块化、时序性添加方案，用于从新鲜或冻存外周血 PBMC（或脐血 CBMC）中，在体外扩增高纯度、高活性的 NK 细胞。本方案不含抗 CD3 抗体、无滋养层细胞，避免了 T 细胞激活带来的复杂性和不确定性，使扩增过程更专注于 NK 细胞。

仅限体外研究使用。

4. 使用说明

以下为基于本试剂盒的 PBMC 扩增 NK 细胞的综合培养流程示例(约 14-21 天)。请根据实际细胞生长情况和需求进行调整。

4.1 模块化添加剂配制与添加说明

本试剂盒的每个模块（Tube A, B, C, D）均包含预计量或浓缩的活性组分，旨

在特定阶段添加到对应的培养体积中以达到最佳终浓度。

培养阶段	时间点	添加模块	配制过程	培养基名称
基础模块	-1 天	Tube A	/	/
初始激活	0 天	Tube B	取 25mL NK 基础培养基，加入 1 支 Tube B	NK 激活培养基
功能增强	2~3 天	Tube C	取 20mL NK 基础培养基，加入 1 支 Tube C	/
扩增维持	5 天+	Tube D1	向剩余的 NK 基础培养基中加入 1 支 Tube D1	NK-EM-D1 培养基
		Tube D2	向另一瓶 1L NK 基础培养基中加入 1 支 Tube D2	NK-EM-D2 培养基

4.2 综合培养流程

步骤	培养时间	使用试剂	培养容器	培养基用量(mL)	血浆用量(mL)	总体积(mL)	备注
包被	-1 天	Tube A	75cm ² 培养瓶	/	/	/	将 Tube A 加入 10mL D-PBS 中；混匀，放入 75cm ² 培养瓶中，水平放平，置于 4℃，过夜。
激活阶段	0 天	Tube B	包被后的瓶子	19	1	20	起始细胞密度： 1×10^6 cells/mL。将 PBMC 重悬于 19mL NK 激活培养基中，并加入 1mL 灭活自体血浆，轻轻混匀。放入 37℃, 5% CO ₂ 培养箱中培养。
功能增强	2/3 天	Tube C	75cm ² 培养瓶	19	1	40	观察细胞状态（瓶底细胞团面积占比 20%以上）。加入 19mL NK 基础培养基+1mL 灭活自体血浆，再加入 Tube C，混匀。请勿吹打瓶底细胞。
补液	5/6 天	Tube D1	75cm ² 培养瓶	33.25	1.75	75	取 NK-EM-D1 培养基 33.25mL，再加入 1.75mL 灭活血浆。请勿吹打瓶底细胞。
换瓶	7 天	Tube D1	175cm ² 培养瓶	71.25	3.75	150	细胞密度显著增高。将细胞转移到新的 175T 培养瓶中，取 71.25mL NK-EM-D1 培养基，再加血浆 3.75mL。

步骤	培养时间	使用试剂	培养容器	培养基用量(mL)	血浆用量(mL)	总体积(mL)	备注
转袋	9 天	Tube D1	1L 或 2L 细胞培养袋	约 148.5	约 1.5	约 300	计数细胞密度。转移到细胞培养袋中。根据计数结果补液 (NK-EM-D1 及 1%自体血浆), 补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。
持续扩增	11 天	Tube D1	细胞培养袋	约 297	约 3	约 600	计数细胞密度, 检验 NK 细胞纯度。根据计数结果补液 (NK-EM-D1 及 1%自体血浆), 补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。
	13 天	Tube D2	细胞培养袋	约 594	约 6	约 1200	根据计数结果补液 (NK-EM-D2 及 1%自体血浆), 补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。若使用 1L 细胞培养袋, 可在此步进行分袋。
高通量	15 天	Tube D2	细胞培养袋	约 594	约 6	约 1800	若使用 2L 细胞培养袋, 加入 594 ml NK-EM-D2, 再加 1%自体血浆, 如果血浆不够, 就全部加入。
收获	17/18 天	/	细胞培养袋	/	/	约 1800	计数细胞密度, 检验 NK 细胞纯度。根据实验需求或细胞状态, 分批或一次性收集细胞。也可延长培养至 21 天以获得更大细胞量。

4.3 参考操作方法

4.3.1 包被

(1) 包被培养瓶的预处理 (-1 天) :

- 取 1 支 Tube A 加入 10mL D-PBS 中, 混匀, 放入 75cm²培养瓶中, 水平放平, 置于 4°C, 过夜。

4.3.2 血浆与 PBMC 分离及接种 (第 0 天)

(1) 自体血浆的分离:

- 将血液以 800g 离心 10 分钟, 吸取上层淡黄色血浆至 50 mL 离心管, 置于 56°C 水浴中灭活 30 分钟后, 再以 800g 离心 10 分钟去除沉淀。

将上清血浆转移至新的 50mL 离心管中,置于 4°C 冰箱保存备用。血液的下层细胞用于提取单个核细胞。

(2) PBMC 的分离:

- 将上步获得的血细胞沉淀加入等体积生理盐水,混匀后缓慢加入到 Ficoll 层 (稀释血细胞: Ficoll=2:1),保持层次分明。室温下以 750g 离心 30 分钟,速度加速 3,减速 0。然后小心吸取中间的白膜层到新的 50mL 离心管中,加入生理盐水到 45mL 吹打混匀后,再以 250g 室温离心 10 分钟,弃去上清液,并重复该洗涤步骤。最后加 5 mL NK 激活培养基重悬 PBMC,取 20 ul 计数 (可加等体积生理盐水稀释)。

(3) 细胞计数和种瓶

- 根据细胞计数结果,取 2×10^7 个细胞总数 (计算毫升数) 到新的 50 ml 离心管中, 补充 NK 激活培养基至终体积 20 ml。
- 提前 10 分钟内, 取出冰箱中 75cm² 包被培养瓶, 吸弃包被液, 备用。
- 转入 75cm² 培养瓶, 放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

4.3.3 功能增强 (第 2 或 3 天)

(1) 观察细胞状态

- 显微镜下观察细胞状态 , 瓶底细胞团面积占比 20%以上。

(2) 添加功能增强模块

- 加入 19 mL 基础培养基、1 mL 灭活自体血浆, 再加入 1 支 Tube C, 轻轻混匀, 终体积 40 mL。
- 注意: 请勿吹打瓶底细胞。

4.3.4 换液 (第 5 或 6 天)

(1) 观察细胞状态

- 显微镜下观察细胞状态 , 中大团细胞变多, 增殖较明显。

(2) 换液操作

- 将 Tube D1 加入剩余的基础培养基中 (约 962mL), 制成 NK-EM-D1。
- 加入配制好的 NK-EM-D1 培养基 33.25mL, 再加入 1.75mL 灭活血浆,

终体积 75mL。

- 注意：请勿吹打瓶底细胞。

4.3.5 培养瓶转移（第 7 天）

(1) 观察细胞状态

- 显微镜下观察细胞状态，细胞密度显著增高。

(2) 换瓶

- 将细胞转移到新的 175cm² 培养瓶中，加入 NK-EM-D1 培养基 71.25mL，再加血浆 3.75mL。终体积 150mL。

4.3.6 培养袋转移（第 9 天）

(1) 换袋

- 计数细胞密度，将培养瓶中的细胞悬液转移到 1L 或 2L 细胞培养袋中。

(2) 补液

- 根据计数结果补液，补 NK-EM-D1 培养基约 148.5mL，添加 1%自体血浆(约 1.5mL)，终体积约 300mL。
- 注意：补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。

4.3.7 持续扩增（第 11 天）

(1) 计数

- 计数细胞密度，检验 NK 细胞纯度。

(2) 补液

- 根据计数结果补液，补 NK-EM-D1 培养基约 297mL，添加 1%自体血浆(约 3mL)，终体积约 600mL。
- 注意：补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。

4.3.8 持续扩增（第 13 天）

(1) 计数

- 计数细胞密度。

(2) 补液

- 将 Tube D2 加入至 1L NK 基础培养基中，制成 NK-EM-D2 培养基。
- 根据计数结果补液,补 NK-EM-D2 培养基约 594mL，加 1%自体血浆(约 6mL)，终体积约 1200mL。
- 补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。
- 若使用 1L 细胞培养袋，可在此步进行分袋。

4.3.9 高通量扩增（第 15 天）

- 根据计数结果补液，约补 594 ml NK-EM-D2，再加 1%自体血浆，如果血浆不够，就全部加入。
- 补液后终体积约 1800mL。
- 补液后调整细胞密度为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。

4.3.10 收获（第 17/18 天）

- 计数细胞密度，检验 NK 细胞纯度。
- 根据实验需求分批或一次性收集细胞悬液。
- 延长培养：可继续补液至 21 天，需额外补充 NK-EM-D2 培养基。

5. 注意事项

5.1 样本要求：

- 建议使用新鲜分离的 PBMC/CBMC，并确保在采血后 12 小时内完成种瓶操作。
- 冻存 PBMC/CBMC 复苏后活率应不低于 80%。冻存密度建议为 $2-4 \times 10^7$ 个/mL。

5.2 起始细胞密度：

- 铺瓶的起始细胞密度建议为 1×10^6 个/mL。如果 PBMC 中红细胞较多，建议进行红细胞裂解或使用荧光细胞计数仪进行准确计数，以避免影响种瓶密度。

5.3 补液密度：

- 每次补液后，细胞密度应保持为 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个/mL。若细胞增殖过快，可适当提前补液时间或增加补液量。

5.4 培养基的使用：

- 每次补液前，需将培养基和添加剂在室温下自然复温至少 1 小时。
- 严禁将整瓶培养基或添加剂放入 37°C 孵箱或水浴锅中强制快速复温，这可能导致细胞因子失活或培养基成分变性。

5.5 血浆的处理和保存：

- 自体血浆需经 56°C 水浴灭活 30 分钟，冷却后离心取上清备用。确保血浆澄清无沉淀。

5.6 培养容器的使用：

- 若使用 2L 细胞培养袋培养细胞体积小于 1L 时，培养袋可能需要适当折叠放置，以确保气体交换均匀和培养液充分覆盖细胞。
- 建议使用经优化验证的培养瓶和细胞培养袋型号，以确保稳定的培养效果。

5.7 培养初期操作：

- 在培养初期（Day 0 - Day 6），请尽量避免随意晃动培养瓶，以免影响活化细胞团的形成和贴壁。后续细胞处于悬浮增殖状态时，可适当晃动以帮助气体交换。

5.8 因子损失：

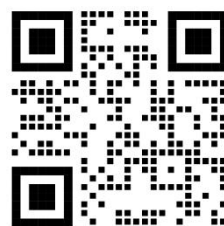
- 为减少细胞因子挂壁损失，建议在使用前，将含因子的离心管（Tube A/B/C/D1/D2），以 1000 rpm 离心 1-2 分钟，使液体充分聚集于瓶底。

5.9 设备与环境：

- 定期检查 CO2 培养箱的温度、CO2 浓度，并及时更换过滤器。定期保养和清洁生物安全柜，确保洁净区环境符合标准。定期更换初效、中效、高效过滤器。

5.10 耗材标准化：

- 建议固定实验耗材（如培养瓶、培养袋等）的种类和型号，任何型号或规格的变更都可能影响培养效果，需提前进行充分评估。



公司网站

