

NK 细胞扩增试剂盒 (K562 滋养层细胞) 说明书

1. 产品描述

NK 细胞扩增试剂盒由激活 NK 细胞的滋养层细胞 (NK 细胞扩增试剂) 以及 NK 细胞基础培养基组成。

NK 细胞扩增试剂为经过辐照灭活的工程化 K562 细胞，该细胞可表达多种细胞因子 (如 IL-21) 。搭配 NK 细胞基础培养基，在多种细胞因子的协同信号作用下，来自脐带血和外周血单个核细胞的 NK 细胞可以有针对性地被激活和扩增，最终获得高纯度的 NK 细胞。

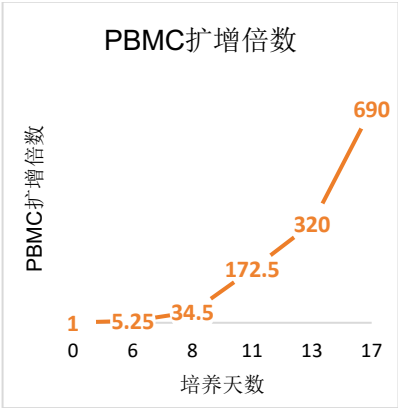


图 1: PBMC 扩增倍数

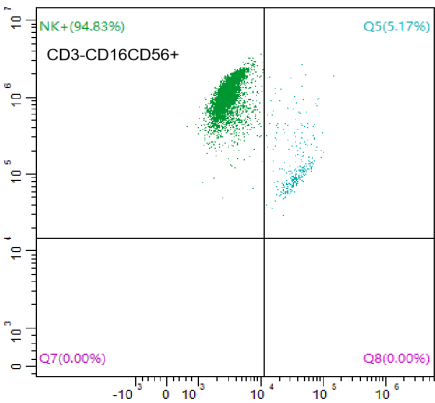


图 2: 扩增后 NK 细胞纯度

2. 产品组成

| 产品名称       | 货号         | 组分     | 规格    | 数量 | 保存条件 |
|------------|------------|--------|-------|----|------|
| NK 细胞扩增试剂盒 | NK- EXP-01 | NK-ER1 | 1mL/支 | 1  | 液氮   |
|            |            | NK-ER2 | 1mL/支 | 4  | 液氮   |

注: NK-ER1 (NK Expansion Reagent 1) ， NK-ER2 (NK Expansion Reagent 2)

3. 使用及操作步骤

3.1 试剂和耗材

| 序号 | 名称 |              | 用量        |
|----|----|--------------|-----------|
| 1  | 试剂 | NK 细胞扩增试剂 A1 | 1 支       |
|    |    | NK 细胞扩增试剂 A2 | 1 支       |
| 2  |    | NK 细胞基础培养基   | 2L        |
| 3  |    | IL-2         | 20 万 IU/支 |
| 4  |    | 生理盐水         | 500mL     |
| 5  |    | 20%人血白蛋白     | 15mL      |
| 6  |    | 淋巴细胞分离液      | 25mL      |

|    |    |                |    |
|----|----|----------------|----|
| 7  | 耗材 | 细胞计数板          | 若干 |
| 8  |    | T25 培养瓶        | 1  |
| 9  |    | T75 培养瓶        | 2  |
| 10 |    | T175 培养瓶       | 3  |
| 11 |    | 细胞培养袋          | 1  |
| 12 |    | 15mL 离心管       | 若干 |
| 13 |    | 50mL 离心管       | 若干 |
| 14 |    | 10mL, 25mL 移液管 | 若干 |
| 15 |    | 1mL            | 若干 |

## 3.2 NK 细胞扩增与培养的关键点与步骤

### 3.2.1 NK 细胞完全培养基的制备

NK 细胞基础培养基 + 自体血浆 (D0-D8: 3%; D8-D10: 1%; D10 之后 (如果有多余的可加 1%, 如无可不添加) + IL-2 (50 IU/mL) 。

### 3.2.2 样本要求

新鲜外周血来源的单个核细胞总数建议控制在 $(10-15) \times 10^6$  个; 脐血来源和冻存的外周血来源的单个核细胞总数建议控制在 $(15-20) \times 10^6$  个; 单个核细胞活率 $\geq 90\%$ 。

### 3.2.3 D0 血浆与 PBMC 分离及接种

- (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 10 mL 的完全培养基重悬离心管中的 PBMC, 取样计数。
- (3) **NK 细胞扩增试剂 (A1) 的复苏:** 取 10 mL 的解冻液 (0.9 %生理盐水+5 %人血清白蛋白) 置于 50 mL 离心管中; 在 37°C 水浴中复苏 NK 细胞扩增试剂 A1, 将复苏后的 NK 细胞扩增试剂 A1 加入上述

10 mL 解冻液中。以 400g 离心 10 分钟后弃去上清液，最后加入 1mL NK 细胞完全培养基，均匀重悬。

- (4) **接种：**根据 PBMC 的计数结果，取  $1 \times 10^7$  个 PBMC 加入已重悬的 NK 细胞扩增试剂中，混合后的 PBMC 与 NK 细胞扩增试剂 (滋养层细胞) 转移至 T75 培养培养瓶中，加入 NK 细胞完全培养基至 20mL，以调整 PBMC 密度为  $5 \times 10^5$  个/mL，在 37 °C 和 5 % CO<sub>2</sub>条件下培养 (培养瓶竖直培养) 。

### 3.2.4 D4 观察换液

显微镜观察细胞状态，将 T75 瓶中细胞转移至 50 mL 离心管，以 400 g 离心 5 分钟，将细胞沉淀用 40 mL NK 细胞完全培养基重悬，不换瓶，在 37 °C 和 5 % CO<sub>2</sub>条件下培养 (培养瓶竖直培养) 。

### 3.2.5 D5-D7 观察补液

每天观察细胞状态，根据细胞悬液颜色或细胞密度进行补液。一般情况下，培养液颜色发生变化或显微镜下观察细胞较多时添加，NK 细胞完全培养基添加量参考 3.2.10 所述。补液后总体积大于 50ml 时，接种至 T175 培养瓶，在 37 °C、5 % CO<sub>2</sub>条件下培养。【每个 T175 培养瓶最大培养体积 250 mL，后续步骤培养瓶可水平放置培养】

### 3.2.6 D8 观察，二次激活与补液

观察细胞，混匀后取样计数。同时，复苏 NK 细胞扩增试剂 A2，按照 3.2.3.3 进行洗涤。将 NK 细胞与重悬后的 NK 细胞扩增试剂 A2 混合，加入 NK 细胞完全培养基并调整 NK 细胞密度至  $(0.8-1) \times 10^6$  个/ mL，当体积大于 200mL 时，可转移至细胞培养袋中培养，在 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>条件下培养。

### 3.2.7 D9-D12 观察补液

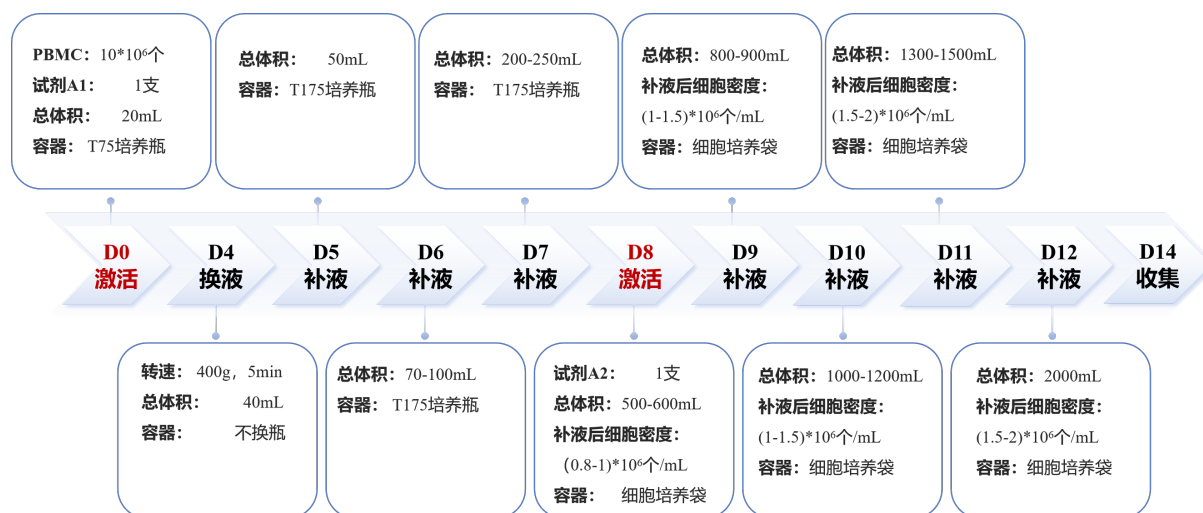
每天观察细胞，根据细胞悬液颜色或细胞密度进行补液；推荐补液后细胞密度 D9-D10 应控制在  $(1.0-1.5) \times 10^6$  个/ mL，第 D11-D12 天应控制在  $(1.5-2.0) \times 10^6$  个/ mL。

### 3.2.8 D14 细胞收获

观察细胞，取样计数，收获细胞，若因实验需要，可适当推后收获细胞使用或进行冻存。

**注：**此 NK 细胞培养步骤仅供参考，由于样品的个体差异、培养方法的调整等因素，NK 细胞扩增和培养的状态可能会有所不同。在此情况下，可通过观察和分析 NK 细胞的生长状况进行适当调整。

### 3.2.9 NK 细胞培养过程数据参考



## 4. 注意事项

- 4.1 血液采集：**建议使用肝素钠抗凝管或柠檬酸钠血液采集袋进行血液采集。
- 4.2 自体血浆：**自体血浆会影响细胞的培养状态，建议预留约 30mL 的自体血浆。溶血和高脂血浆可能会影响 NK 细胞的扩增状态。
- 4.3 试剂用途：**该试剂仅用于体外诱导培养以获得 NK 细胞，其组分不能与其他批次的试剂混用。
- 4.4 包装管完整性：**如果试剂的外包装管出现裂纹，应立即停止使用。
- 4.5 操作环境：**操作过程应在无菌环境中进行，所有接触细胞液的试剂和耗材必须严格无菌。
- 4.6 试剂使用：**试剂开封后必须一次性使用，不得重复冻融后使用。
- 4.7 试剂复苏：**为确保试剂的活性，复苏过程应严格遵循 NK 细胞扩增试剂的复苏要求。禁止将培养试剂管直接完全浸没在水浴中，保障管盖高于水浴液面。
- 4.8 细胞团聚现象：**在 NK 细胞培养的早期阶段，细胞团聚是正常现象，但需要注意操作中尽量避免破坏细胞团聚，以免影响 NK 细胞的后续扩增状态。

**4.9 培养基使用：**使用培养基前应在室温下自然回温，以完成复温操作，完全培养基先用现配。

**4.10 其他：**本产品仅供体外研究使用。