

# 人 NK 细胞高效扩增试剂盒使用说明书

## 【产品名称】

中文名称：人 NK 细胞高效扩增试剂盒

英文名称：Human NK cell robust expansion kit

## 【编号】

CT-001

## 【包装规格】

2L/套

## 【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
NK-I	无色透明液体	125 $\mu$ L/支	1 支
NK-II	无色透明液体	300 $\mu$ L/支	1 支
NK-III	白色固体粉末	500mg/支	1 支
NK-IV 培养基	红色澄清液体	1L/瓶	2 瓶

## 【预期用途】

适用于从人新鲜外周血、新鲜脐血、浓缩白细胞来源的单个核细胞以及冻存的外周血或脐血源单个核细胞在体外扩增成 NK 细胞。

## 【贮藏条件与有效期】

试剂盒中 NK-I, NK-II, NK-III 及 NK-IV 均置于 2-8 $^{\circ}$  C 保存，有效期为 12 个月；

生产日期，有效期至：见标签。

## 【产品简介】

NK 细胞是人体免疫的第一道防线，具有非限制性杀伤的特点，如何发挥 NK 细胞的免疫作用从而治疗肿瘤等疾病是一个重要的课题。因为 NK 细胞仅占外周血的 5-10%，细胞数量的稀少往往是制约研究的一个重要原因。本产品用于从单个核细胞（MNC）在体外高效扩增成 NK 细胞，具有扩增效率高，目的细胞百分比高的特点，起始单个核细胞经过 14 天培养，总细胞数可以扩增约 50 倍左右，NK 细胞数可以扩增 500 倍以上，且纯度可达 70%-85%（由于个体差异，有的样品诱导后 NK 细胞纯度低于 70%或高于 85%）。

## 【操作步骤】

### 一 血浆的提取与保存

注意：

- 1) 禁止使用 EDTA 抗凝的血样，因为 EDTA 会极大影响 NK 细胞的激活与增殖；
- 2) 所取血样最好不超过 12 小时，因为血样的时间越长，所提取的 PBMC 中杂细胞越多，且 PBMC 的活性会降低；

- 1.将取到的外周血置于 50mL 离心管中，室温下 650g，离心 15min；
- 2.取上层黄色血浆部分于新的 50mL 离心管中（下层为血液细胞成分，用于后续单个核细胞的提取）；
- 3.将血浆置于 56° C 水浴锅中灭活 30min；
- 4.血浆灭活完毕后，可见血浆呈现浑浊状，900g，离心 10min；
- 5.取上清，于-20° C 冷冻 15min；
- 6.冷冻完毕后，再次 900g，离心 10min，取上清，于 4° C 保存待用。

### 二 单个核细胞的提取

- 1.取血浆提取步骤的下层红色细胞沉淀，加入生理盐水或 PBS 至原体积；
- 2.取 2 支 50mL 离心管，分别加入 15mL 淋巴细胞分离液，并将 1 步骤中的稀释血液分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层；

**注意：**铺加血样时建议速度适中，尤其是刚开始时的铺加，避免破坏淋巴细胞分离液与血样的界面。

- 3.室温下，800g 离心 20min（无闸减速）；
- 4.离心后，离心管中样品由上到下分为 4 层：血浆层-白膜层-人淋巴细胞分离液层-红细胞与粒细胞的沉淀。分别小心吸取白膜层及其以下约一半的液体于新的离心管中，并加入生理盐水或 PBS 至 40mL 体积，混匀，300g 离心 10min；

- 5.弃上清，沉淀再次用 40mL 的生理盐水或 PBS 重悬，300g 离心 10min；
- 6.弃上清，沉淀少许 NK-IV 培养基重悬，合并，取部分细胞悬液计数，备用。

### 三 单个核细胞接种与补液

**1.T75 瓶包被** 将 7mL PBS 加入到 T75 细胞培养瓶中，再将 NK-I 加入到 T75 瓶中，充分混匀后，将细胞培养瓶水平静置于二氧化碳培养箱 37°C 孵育 2h（不能低于 1h）。孵育完毕后，吸去包被液，再用 10mL PBS 轻柔摇晃洗涤细胞培养瓶，弃去清洗液待用；

**注意：**

1) 细胞培养瓶必须是经 TC 处理的培养瓶，严禁使用未经 TC 处理的培养瓶以及经过特殊处理专用于干细胞培养的培养瓶；

2) 包被培养瓶时要水平放置，并要求包被液完全覆盖培养瓶底面；

3) 若包被瓶未能及时使用，可将培养瓶用封口膜封口，置于 4°C 保存 2 天。

**2.第 0 天**，配制 50mL NK 细胞完全培养基：NK-IV 培养基 45mL，10%已热灭活的自体血浆(5mL)，NK-II 300 $\mu$ L，NK-III 250mg（NK-III 为每支 500mg，用 1mL NK-IV 培养基溶解，取一半用于本试剂盒）以及 IL-2（完全培养基中 IL-2 终浓度为 1000IU/mL），将制备好的单个核细胞(MNC)按 1-1.5M cells/mL 的细胞密度接种于已包被的含有 50mL NK 细胞完全培养基的 T75 瓶中；

**注意：**

1) 每支 IL-2 使用 1mL NK-IV 培养基溶解后，可存于 2-8°C 冰箱，存放时间不超过两周。建议将 IL-2 溶解后分装于无菌试剂管后保存于-20°C 冰箱，使用时溶解即可，注意不要反复冻融，且不可使用长期置于 2-8°C 的 IL-2，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果；

2) 在细胞接种后与第 3 天补液之前的这段时间内，尽可能不要移动培养瓶，以免使其受到温度变动，震荡等物理因素的干扰。

3) NK-IV 在使用前，需先将其室温平衡 30min 以上，切勿将培养基直接从冰箱中拿出使用，否则可能导致细胞出现应激反应。

**3.第 3 天 (3 $\times$ 24h)**，补加 NK-IV 培养基 95mL，5%已热灭活的自体血浆(5mL) 以及 IL-2 (IL-2 终浓度为 1000IU/mL)，转入细胞培养袋，此时培养袋含 150mL 培养基；

**注意：**

为使更多的细胞转入到培养袋中，可先将 T-75 瓶中的细胞吹打均匀，全部转入培养袋中，再用部分新鲜配制的培养液润洗培养瓶，并再次转入培养袋中，最后补齐培养液即可；

**4.第 5 天**，往培养袋补加 NK-IV 培养基 150mL，1%已热灭活的自体血浆 1.5mL 以及 IL-2 (IL-2 终浓度为 1000IU/mL)，此时袋子含 300mL 培养液；

**5.第 7 天**，往培养袋补加 NK-IV 培养基 300mL，剩余的所有自体热灭活血浆以及 IL-2 (IL-2

终浓度为 1000IU/mL)，然后分成两袋，此时每个袋子含 300mL 培养液；

**6.第 9 天**，分别往每个培养袋补加 NK-IV 培养基 300mL 以及 IL-2(IL-2 终浓度为 1000IU/mL)，此时每个袋子含 600mL 培养液；

**7.第 11 天**，分别往每个培养袋补加 NK-IV 培养基 400mL 以及 IL-2(IL-2 终浓度为 1000IU/mL)，此时每个袋子含 1000mL 培养液；

**8.第 13 天，或 14 天**，收获 NK 细胞。

本试剂盒无配备 IL-2，客户需自行购买添加。

### 【注意事项】

1. 使用本试剂盒时，可先将 NK-I，NK-II 试剂管低速离心（如 1000g/min 离心 1min 等），确保试剂足量；
2. 由于样本之间的差异性，在按上述说明操作时，可根据具体细胞生长状态，调整补液时间；
3. 在使用本试剂盒时，由于样本之间的差异性，每个样本的细胞长速与诱导率存在差异。

### 【产品性能指标】

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

本产品仅限科学研究使用，不用于临床诊断与治疗。

### 【生产企业】

企业名称：福建三一造血技术有限公司

生产地址：福建省福州市高新技术产业园创新园 10 号楼

邮政编码：350108

电话号码：（0591）22889285/4001155980

邮箱地址：sales@stemery.cn

网址：<http://www.stemery.cn>

