

## SUPERCULTURE 自然杀伤（NK）细胞诱导培养试剂盒3.0说明书

Cat#: 6813551/6813552/6813553

## 【产品名称】

自然杀伤（NK）细胞诱导培养试剂盒3.0

## 【产品描述】

自然杀伤（NK）细胞诱导培养试剂盒3.0是一款GMP级别、无饲养层细胞、适用于NK细胞体外诱导扩增的培养试剂盒，包括NK细胞包被剂、NK细胞诱导剂、NK细胞活化剂、NK细胞培养补充剂和N300 NK细胞无血清培养基。本产品批间质量稳定，用于脐带血体外诱导扩增NK细胞。

## 【包装规格】

成品名称	成品货号	规格	组分名称	组分规格	数量
自然杀伤（NK）细胞诱导培养试剂盒3.0	6813551	3 L体系	NK细胞包被剂	300 $\mu$ L	1 支
			NK细胞诱导剂	600 $\mu$ L	1 支
			NK细胞活化剂	500 $\mu$ L	3 支
			NK细胞培养补充剂	42 mL	1 瓶
			N300 NK细胞无血清培养基	1 L	3 瓶
	6813552	2 L体系	NK细胞包被剂	200 $\mu$ L	1 支
			NK细胞诱导剂	400 $\mu$ L	1 支
			NK细胞活化剂	500 $\mu$ L	2 支
			NK细胞培养补充剂	28 mL	1 瓶
6813553	1 L体系	N300 NK细胞无血清培养基	1 L	2 瓶	
		NK细胞包被剂	100 $\mu$ L	1 支	
		NK细胞诱导剂	200 $\mu$ L	1 支	
		NK细胞活化剂	500 $\mu$ L	1 支	
		NK细胞培养补充剂	14 mL	1 瓶	
			N300 NK细胞无血清培养基	1 L	1 瓶

## 【储存条件及有效期】

NK细胞包被剂、NK细胞诱导剂、NK细胞活化剂、NK细胞培养补充剂，-15 $^{\circ}$ C~ -25 $^{\circ}$ C保存，有效期一年。

N300 NK细胞无血清培养基，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C避光保存，有效期一年。

## 【使用方法】

以1L体系为例。

## 一、样本要求

新鲜/冻存的脐带血单个核细胞（UBMCs）。

## 二、准备工作

## 1. T25 包被瓶准备

第-1天，将3 mL PBS与100  $\mu$ L NK细胞包被剂混匀后加入T25培养瓶中，平放晃匀，铺满瓶底后置于4 $^{\circ}$ C包被过夜（紧急条件下或37 $^{\circ}$ C包被2 h）。包被完成后，吸走多余的包被液，使用10 mL PBS轻柔的清洗瓶底待用，注意不要冲刷培养瓶底部。

## 2. 配制 NK 细胞扩增培养基

每 1 L N300 NK 细胞无血清培养基加入 1 支 500  $\mu$ L NK 细胞活化剂，为 NK 细胞扩增培养基。NK 细胞扩增培养基于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期为三周。

## 3. 配制 NK 细胞激活培养基

取出 25 mL NK 细胞扩增培养基，加入 200  $\mu$ L NK 细胞诱导剂，配置为 NK 细胞激活培养基，于 NK 培养中 D0 及 D3 补液使用。

## 4. NK 细胞培养

- (1) 第 0 天，使用 10 mL NK 激活培养基（含 10% 自体血浆和 10% NK 细胞培养补充剂）将 UBMCs 按 2.5~3.0 $\times 10^6$  个/mL 的浓度接种于已包被的 T25 细胞培养瓶中，摇匀细胞后置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**\*注意：**若脐血中抗凝剂占比过高，可不添加自体血浆进行培养。

- (2) 第 3 天，观察细胞状态，于原来的 T25 中直接补加 15 mL NK 激活培养基（含 10% 自体血浆和 10% NK 细胞培养补充剂），轻柔补液，勿直接吹打细胞。

**\*注意：**T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。

- (3) 第 5 天，观察细胞状态，取样计数。若细胞浓度小于 1.4 $\times 10^6$  个/mL，则补加 25 mL NK 扩增培养基（含 5% 自体血浆和 5% NK 细胞培养补充剂）；若细胞浓度大于 1.4 $\times 10^6$  个/mL，则补加 55 mL NK 扩增培养基（含 5% 自体血浆和 5% NK 细胞培养补充剂）。
- (4) 第 7 天，观察细胞状态，取样计数。参照补液程序，补加 NK 扩增培养基（含 2.5% 自体血浆和 2.5% NK 细胞培养补充剂）。
- (5) 第 9 天，观察细胞状态，取样计数。参照补液程序，补加 NK 扩增培养基（含 1% NK 细胞培养补充剂）。
- (6) 第 11 天，观察细胞状态，取样计数。参照补液程序，补加 NK 扩增培养基（含 0.5% NK 细胞培养补充剂）。
- (7) 第 14 天，观察细胞状态，取样计数。参照补液程序，补加剩余的 NK 扩增培养基使终体积为 1000 mL（含 0.5% NK 细胞培养补充剂）。
- (8) 第 16~18 天，观察细胞状态，拍照、取样计数细胞浓度，收集细胞作后续使用。

**\*注意：**

① D0、D7、D17 天流式测阳性率，可根据细胞生长状况适当提前或延迟收获时间。

② 脐血来源的 NK 细胞体外扩增效果因供体而异，上述的培养方案是经优化后较为稳定的培养程序。因 NK 供体的差异，导致 NK 细胞可能比预期的扩增更快或更慢，建议培养周期中仔细观察细胞生长状况，灵活调整补液和收集步骤，以充分发挥试剂盒的体外扩增性能。

### 附：脐血单个核细胞分离方法

1. 向 50 mL 离心管中倒入抗凝全血，700 g 离心 15 min（升速 8 降速 4），转移血浆层至新的离心管中，于 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min，900 g 离心 10 min，上清于 -20 $^{\circ}$ C 放置 20 min，再次 900 g 离心 10 min，上清于 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

2. 向下层红色液体中加入与灭活血浆同等体积的 PBS，混匀后按照全血体积：红细胞沉降液 3:1~4:1 的比例加入红细胞沉降液沉降 30 min 左右，直至血浆：RBC 之间的界面在约占总体积 50% 的位置，取出沉降上清于 50 mL 离心管中，颠倒混匀。

3. 取一定体积（分离液与沉降上清的体积比为 1:1）的分离液于离心管中，将上清平铺到分离液液面上方，800 g，20 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟（升速 3 降速 3）后，得到高纯度的单个核细胞层。

4. 吸取中间 UBMCs 白膜层，使用 50 mL 的 RPMI 1640 洗涤 2 次（250 g，10 min，20 $^{\circ}$ C），用 5 mL 的 RPMI 1640 将 UBMCs 重悬，稀释后计数，即得到 UBMCs。







表1 补液参考程序

时间	培养容器	培养基	补液体积	血浆体积	NK 细胞培养补充剂	总体积	备注
D -1	T25	/	/	/	/	/	4°C包被过夜
D 0	T25	激活培养基	8	1	1 (10%)	10	接种密度 2.5~3.0*10 <sup>6</sup> 个/mL
D 3	T25	激活培养基	12	1.5	1.5 (10%)	25	勿吹打细胞， 避免干扰细胞正常激活
D 5	T175	扩增培养基	22.5/49.5	1.25/2.75	1.25/2.75 (5%)	50/80	控制补液后 密度在 0.5~1.0*10 <sup>6</sup> 个/mL
D 7	T175/ 培养袋	扩增培养基	95/152	2.5/4	2.5/4 (2.5%)	150/240	
D 9	培养袋	扩增培养基	150/160	0	1.5/1.6 (1%)	300/400	控制补液后 密度在 1.0*10 <sup>6</sup> 个/mL 左右
D 11	培养袋	扩增培养基	250	0	1.25 (0.5%)	550/650	
D 14	培养袋	扩增培养基	450/350	0	2.25/1.75(0.5%)	1000	加入剩余培养基
D16/ D18	培养袋	扩增培养基	/	/	/	1000	收集细胞

**【注意事项】**

- 本品避免反复冻融，使用时注意无菌操作。
- NK细胞培养补充剂可支持NK细胞的高效扩增，放置于37°C解冻，分装后按照一定比例添加至培养基中使用，勿反复冻融。
- 建议初始接种密度为2.5~3.0\*10<sup>6</sup> 个/mL，冻存UBMC可提高至3.0~3.5\*10<sup>6</sup> 个/mL。过高或过低的接种密度会影响NK细胞扩增效果。
- 使用PBS稀释NK细胞包被剂后于4°C平放过夜。（紧急情况下可37°C包被2小时）
- 使用前，培养基室温平衡，或取出当天预计用量，预温至37°C，请勿整瓶培养基放置37°C反复预温。
- 细胞传代操作需轻柔，避免造成细胞机械性损伤。
- 3L体系适用于7.5~9.0\*10<sup>7</sup> 个UBMCs；2L体系适用于5.0~6.0\*10<sup>7</sup> 个UBMCs；1L体系适用于2.5~3.0\*10<sup>7</sup> 个UBMCs。
- NK细胞培养扩增前期呈现聚团生长，尽量轻柔补液，不可晃动细胞，避免干扰NK细胞的正常激活。同时注意，D0及D3使用NK激活培养基，后续使用NK扩增培养基。
- NK细胞进入培养袋培养后，建议根据培养体积对折培养袋使用。

## 【产品标签符号说明】

产品标签符号	说明	产品标签符号	说明
REF	产品编号	LOT	批次代码
	生产日期		温度极限
	有效期		查阅使用说明
	制造商		避光保存

## 【相关产品】

名称	货号	规格
自然杀伤（NK）细胞诱导培养试剂盒2.0	6813531	3 L体系
	6813532	2 L体系
	6813533	1 L体系
人淋巴细胞分离液	7111011	100 mL/瓶
	7111012	250 mL/瓶
红细胞沉降液	7131011	100 mL/瓶
细胞培养袋	6071011	640 cm <sup>2</sup> , 10个/包
	6071012	640 cm <sup>2</sup> , 10个/包×10, 100个/箱

## 【产品说明书修改日期】

2024年07月19日

## 【公司信息】

生产企业：深圳市达科为生物工程有限公司

网址：www.dakewe.com

电话：（86-755）86235300

邮箱：RD@dakewe.com

地址：深圳市坪山区坑梓街道金辉路 14 号深圳市生物医药创新产业园区 1 号楼 702、703