

NK细胞高效扩增试剂盒

Natural Killer Cell Expansion Kit

产品信息

| 产品名称 | 产品编号 | 产品规格 | 储存条件 |
|--|------------|--------|-------|
| NK细胞基础培养基 (Natural killer cells Basal Medium) | IMC-016-BM | 1 L*2 | 4°C |
| NK 添加剂 A | IMC-016-A | 1 mL/支 | -20°C |
| NK 添加剂 B | IMC-016-B | 1 mL/支 | -20°C |
| NK 添加剂 C | IMC-016-C | 1 mL/支 | -20°C |
| NK 添加剂 D | IMC-016-D | 1 mL/支 | -20°C |
| NK 添加剂 E | IMC-016-E | 1mL/支 | -20°C |

适用范围

用于外周血或脐血体外诱导扩增NK细胞。

产品简介

采用自体外周血细胞中分离得到的单个核细胞，经体外操作使 NK 细胞扩增活化，通过激活体内免疫反应达到杀灭肿瘤细胞。本产品能够将外周血中的单个核细胞大规模扩增成NK细胞，具有操作简单，无需预包被，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，CD3⁺/CD56⁺NK细胞绝对数量可扩增达到1000倍，其纯度可达80%以上。

有效期

十二个月

样本要求

单个核细胞存活率高于90%，新鲜外周血来源的单个核细胞总数建议控制在 $(20-25) \times 10^6$ 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 $(25-30) \times 10^6$ 个。

操作步骤

1、所需主要试剂耗材

| 序号 | 名称 | | 用量 |
|----|----|-----------|-------------|
| 1 | 试剂 | NK细胞基础培养基 | 2 L |
| 2 | | NK 添加剂 A | 1支, 1 mL /支 |
| 3 | | NK 添加剂 B | 1支, 1 mL /支 |
| 4 | | NK 添加剂 C | 1支, 1 mL /支 |

| | | | |
|----|-------------------------|----------|-------------------------|
| 5 | 试剂 | NK 添加剂 D | 1支, 1mL /支 |
| 6 | | NK 添加剂 E | 1支, 1mL /支 |
| 7 | | 葡萄糖酸钙注射液 | 血浆量的8% |
| 8 | | PBMC分离液 | 约25 mL |
| 9 | | 清洗液 | 约100 mL |
| 10 | | 台盼蓝 | 若干 |
| 11 | | 耗材 | 640 cm ² 培养袋 |
| 12 | 225 cm ² 培养瓶 | | 1个 |
| 13 | 75 cm ² 培养瓶 | | 1个 |
| 14 | 15 mL离心管 | | 约10支 |
| 15 | 1.5 mL离心管 | | 若干 |
| 16 | 10 mL、25 mL、50 mL移液管 | | 若干 |
| 17 | 200 μL移液器吸头 | | 若干 |

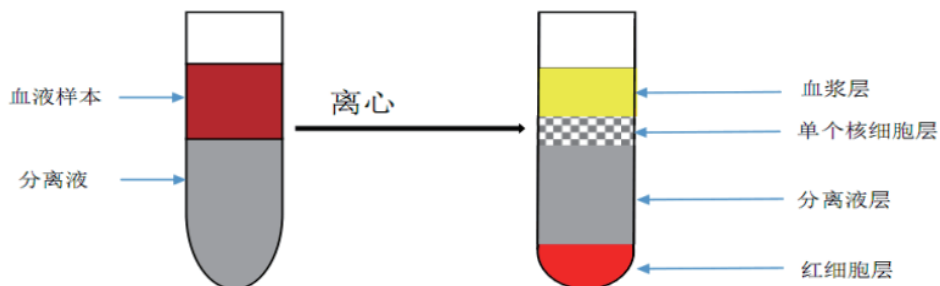
2、操作方法

2.1 血液分离

血液样本量25 mL 时，实验方法如下(需根据PBMC分离液的实际说明书进行调整)：

- (1) 取5支 15 mL 离心管，各加入 5 mL PBMC分离液(与血液体积相同)。
- (2) 吸取血液样本加于分离液之液面上，800 g，离心 20 min，慢升慢降，若血液储存超过2小时，请将离心时间增加至30 min。
- (3) 离心后，此时离心管中由上至下分为四层。第一层为血浆层。第二层为环状乳白色单个核细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。

分离图例



2.2 灭活自体血浆

- (1) 收集上层血浆到新的离心管中；
- (2) 56 °C 加热血浆 30 min (可加8%葡萄糖酸钙注射液混匀后共同灭活)；
- (3) 室温下, 1200 xg 离心 10 min；
- (4) 用移液管将上清液采集至新的离心管, 4 °C 保存, 直至使用前取出。

2.3 制备PBMC

- (1) 吸取第二层环状乳白色单个核细胞层到另一 15 mL 离心管中, 向所得离心管中加入 10 mL 清洗液, 混匀细胞。
- (2) 500 xg, 离心 10 min, 弃上清。
- (3) 重复洗涤3次, 弃上清。

2.4 NK细胞扩增培养

- (1) 完全培养基的配制: 分别添加500 μL NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D因子加入到2瓶1L基础培养基中 (按照1:2000比例添加)。
- (2) Day 0: 用25 mL完全培养基重悬PBMC, 加5%自体血浆, 铺于T75瓶中。
- (3) Day3: 补加25 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D因子), 加5%自体血浆, 此时瓶子含50 mL培养基。一般情况下, 培养液颜色发生变化或细胞较多时添加。
- (4) Day 5: 往培养瓶中补加50 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D因子), 加5%自体血浆, 转入T225瓶中, 此时瓶子含100 mL培养液。
- (5) Day 7: 往瓶中补加150 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D因子), 另外往培养基中补加NK 添加剂E (按照NK 添加剂E因子与培养基的比例为1:2000添加), 细胞浓度控制在 1.0×10^6 Cell/mL, 加1%自体血浆, 此时瓶中含250 mL 培养液, 细胞转袋前将培养瓶底部的细胞进行轻微吹散细胞, 切勿剧烈吹打。
- (6) Day 9: 往培养袋补加250 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D、NK 添加剂E因子), 加1%自体血浆, 此时袋子含500 mL培养液。
- (7) Day 11: 往培养袋补加500 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D、NK 添加剂E因子), 加1%自体血浆, 此时袋子含1000mL培养液。
- (8) Day 13: 往培养袋补加1000 mL培养基 (含NK 添加剂A、NK 添加剂B、NK 添加剂C、NK 添加剂D、NK 添加剂E因子), 此时袋子含2000 mL培养液。
- (9) 推荐细胞浓度8-9天应控制在 $(1.0-1.5) \times 10^6$ Cell/mL, 第10-11天应控制在 $(1.5-2.0) \times 10^6$ Cell/mL。

| 时间 | Day0 | Day1 | Day2 | Day3 | Day4 | Day5 | Day6 | Day7 | Day8 | Day9 | Day10 | Day11 | Day13 | Day14 |
|----------|---------------------------------|------|------|------|----------------|------|------|---------------------------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| 处理过程 | 起始 | 不处理 | 不处理 | 加液 | 加液或不处理 | | 不处理 | 加液 | 不处理 | 加液 | 不处理 | 加液 | 加液 | 收集 |
| 细胞状态 | 细胞浓度在 1.0×10^6 Cell/mL | / | / | / | 培养液颜色明显变化或细胞较多 | | / | 细胞浓度在 1.0×10^6 Cell/mL | 细胞浓度在 $1.0-1.5 \times 10^6$ Cell/mL | | 细胞浓度在 $1.5-2.0 \times 10^6$ Cell/mL | | / | / |
| 总体积 (mL) | 25 | / | / | 50 | 100 | | / | 250 | / | 500 | / | 1000 | 2000 | / |

备注: 由于样品个体差异、培养方式调整等因素, 培养液体积会出现上下浮动, 需要对NK细胞生长状况进行观察分析后, 进行调整。

2.5 细胞收集

- (1) 培养 14 天, 扩大培养成功后取样检测细胞表型、真菌、细菌、支原体、内毒素等指标;
- (2) 收集培养 14 天后的细胞, 将细胞悬浮液从培养袋转入离心瓶, 以 680 g 离心 10 分钟;
- (3) 弃去细胞上清液, 用含有 0.1% 人血白蛋白的生理盐水悬浮细胞, 收集到一个离心瓶中。重复离心, 清洗细胞 3 次;
- (4) 通过一次性细胞筛过滤, 收集并注入含有 1% 人血白蛋白的生理盐水中。

注意事项

1. 血液采集建议使用肝素钠抗凝管或枸橼酸钠采血袋。
2. 自体血浆会影响细胞的培养状态, 建议自体血浆预留量为 30 mL 左右。溶血、高脂肪可能会影响 NK 细胞的扩增。
3. 前 7 天补液时, 必须将培养基进行室温平衡或者水浴箱温育培养基, 避免低温对细胞生长的影响。
4. 细胞培养过程中, 培养前 7 天出现细胞成团属于正常现象, 操作过程请注意不要破坏细胞团。
5. 如果试剂外包装管出现裂缝, 应立即停止使用。
6. 应严格按照贮存要求贮存。
7. 操作过程应在无菌环境下进行。必须保证操作过程中使用的所有容器及所有直接接触细胞液的器具严格无菌。
8. 本试剂开封后必须一次性使用完毕, 不得反复冻融。
9. 非最后的确定版本, 随着研究的进步, 日后会继续更新。
10. 实验过程中产生的洗涤液和各种废弃物应根据相应法规和地方监管部门要求进行处理。