

ArtMedia® Human NK Cell Serum-Free Expansion Kit

NK细胞无血清扩增试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: MK101

版本号: Version 1.0

保存: 各组分在相应温度下保存一年。

产品说明

ArtMedia® Human NK Cell Serum-Free Expansion Kit是一款专为NK细胞培养而设计的无血清、无异源成分的纯因子体外诱导扩增试剂盒, 包括NK细胞无血清培养基、NK激活因子、NK细胞因子I、NK细胞因子II和NK细胞因子III, 适用于新鲜或冻存的外周血及脐带血中NK细胞的培养和扩增。

产品特点

- 无血清、无异源成分, 化学成分明确
- 纯因子试剂盒, 无需使用滋养层细胞
- 含酚红, 不含抗生素
- 扩增快、活率高、纯度高、杀伤能力强
- 按照GMP标准生产和管理

试剂盒组成

Component	MK101-01 (1 L)	MK101-02 (2 L)	Storage
NK细胞无血清培养基	1000 ml	1000 ml×2瓶	2-8℃
NK激活因子	1支, 100 µl/支	2支, 100 µl/支	-18℃及其以下避光保存 避免反复冻融
NK细胞因子I	1支, 100 µl/支	2支, 100 µl/支	
NK细胞因子II	1支, 干粉	2支, 干粉	
NK细胞因子III	1支, 1 ml/支	2支, 1 ml/支	

操作步骤 (以外周血单个核细胞为例)

自备

Component	Catalog
Human Peripheral Blood Lymphocyte Separation Solution	TransGen, Cat. FB102-02
PBS (1×)	TransGen, Cat. FG701-01
25 cm ² 培养瓶	TransGen, Cat. CFE-F4025-01
175 cm ² 培养瓶	TransGen, Cat. CFE-F4175-01
2 L细胞培养袋	
2.5 L细胞培养袋	

外周血PBMC的分离

- 1) 自体血浆的提取与灭活: 抗凝血室温下650×g离心15分钟, 取上层黄色血浆部分 (下层为血液细胞成分, 用于后续PBMC的提取) 置于56℃水浴锅中灭活30分钟; 灭活后, 900×g离心10分钟; 取上清, 于-20℃冷冻15分钟; 再次900×g离心10分钟, 取上清, 于4℃保存待用, 两周内使用; 提取后的血浆如不立即使用, 应转入-20℃, 长期保存。注意: 避免使用EDTA抗凝血样, 因为EDTA会极大影响NK细胞的激活与增殖, 推荐肝素抗凝; 所取血样最好不超过12小时。
- 2) PBMC的分离: 取血浆提取步骤的下层红色沉淀, 加入与原血体积相同的PBS充分稀释; 向淋巴细胞分离液 (TransGen, Cat: FB102) 缓慢铺加稀释血液 (淋巴细胞分离液的体积与原血体积相同), 注意铺加速度适中 (可参考TransGen, Cat: FB102的操作步骤)。室温下, 800×g离心20分钟 (转速缓升缓降); 离心后, 小心吸取白膜层于新的离心管中, 并加入PBS混匀, 此刻PBS的用量为白膜层溶液体积5-10倍, 然后300×g离心10分钟; 弃上清, 沉淀再次用5-10倍体积的PBS清洗重悬, 细胞计数, 300×g离心10分钟; 弃上清, 细胞备用。



1 L培养体系操作说明 (20-30 ml血)

- 1) 培养瓶的预处理(-1天或第0天): 取5 ml PBS, 加入1支NK激活因子, 上下颠倒混匀后, 加至1个T25细胞培养瓶中, 前后左右晃动, 使液体均匀分散在瓶底, 2-8℃包被过夜或37℃培养箱孵育2 h。注意: 包被好的培养瓶若不马上使用, 可置于2-8℃冰箱储存, 建议3天内使用。
- 2) NK激活培养基1的配制: 取10 ml NK细胞无血清培养基, 加入12.5 μ l NK细胞因子I, 混匀备用。
- 3) 细胞接种(第0天): 提前20-30分钟取出2-8℃包被过夜或者37℃孵育的培养瓶平衡至室温, 然后弃掉包被液。向T25瓶接种9 ml NK激活培养基1、1 ml热灭活自体血浆和PBMC (推荐PBMC接种密度为 $1.5-2.5 \times 10^6/\text{ml}$)。前后左右晃动, 放入37℃, 5% CO₂培养箱中培养。注意: 若为冻存PBMC, 建议接种密度为 $2.0-3.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 4) NK完全培养基的配制: 1支NK细胞因子II用1 ml NK细胞无血清培养基溶解, 以1:1000的比例添加至NK细胞无血清培养基中, 混匀备用。(是否加入双抗或者其他抗生素可根据实际实验需要)。
- 5) NK激活培养基2的配制: 取60 ml NK完全培养基, 加入剩余NK细胞因子I, 混匀备用。
- 6) 第3天补液: 沿培养瓶侧壁缓慢补加培养基, 补加18 ml NK激活培养基2和2 ml热灭活自体血浆, 此时液体总体积为30 ml。注意: 避免触碰培养瓶底部, 切勿吹打细胞, 前5天尽量减少计数、观察等操作, 避免影响细胞初期生长。
- 7) 第5天扩瓶培养: 将T25培养瓶中细胞完全吹打下来, 转移到T175瓶中, 并补加38 ml NK激活培养基2和2 ml热灭活自体血浆。
- 8) NK扩增培养基的配制: 剩余的NK完全培养基, 以1000:1的比例添加NK细胞因子III, 混匀备用。
- 9) 第7天补液: T175瓶中补加130 ml NK扩增培养基和1.3 ml热灭活自体血浆。如血浆量不足, 则将剩余血浆全部添加进去。
- 10) 第9天转袋: 将T175培养瓶中细胞完全吹打下来, 转移到培养袋中并补加350 ml NK扩增培养基。注意: 如细胞培养袋中液体<500 ml, 需将培养袋折叠放置, 上袋后尽量每天可以摇晃细胞袋, 并拍散细胞团, 防止细胞增殖过快结团太大。
- 11) 第11天补液: 视细胞生长状态, 建议补加NK扩增培养基450 ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 12) 培养至第14-16天: 根据细胞状态进行细胞收获。

参考补液程序 (1 L体系)

时间	试剂	细胞密度($10^6/\text{ml}$)	容器	补液体积	总体积	补加血浆量	补加血浆比例
D0	NK激活培养基1	1.5-2.5	T25	10 ml	10 ml	1 ml	10%
D3	NK激活培养基2	1.5-2.5	T25	20 ml	30 ml	2 ml	10%
D5	NK激活培养基2	0.5-1	T175	40 ml	70 ml	2 ml	5%
D7	NK扩增培养基	0.5-1	T175	130 ml	200 ml	1.3 ml	1%
D9	NK扩增培养基	0.5-1	2 L细胞培养袋	350 ml	550 ml	0 ml	0%
D11	NK扩增培养基	0.5-1	2 L细胞培养袋	450 ml	1000 ml	0 ml	0%
D14-D16	收获细胞 (1000 ml)						

2 L培养体系操作说明 (50 ml血)

- 1) 培养瓶的预处理(-1天或第0天): 取10 ml PBS, 加入2支NK激活因子, 上下颠倒混匀后, 加至2个T25细胞培养瓶中, 每个5 ml, 前后左右晃动, 使液体均匀分散在瓶底, 2-8℃包被过夜或37℃培养箱孵育2 h。注意: 包被好的培养瓶若不马上使用, 可置于2-8℃冰箱储存, 建议3天内使用。
- 2) NK激活培养基1的配制: 取20 ml NK细胞无血清培养基, 加入25 μ l NK细胞因子I, 混匀备用。
- 3) 细胞接种(第0天): 提前20-30分钟取出2-8℃包被过夜或者37℃孵育的培养瓶平衡至室温, 然后弃掉包被液。每个T25瓶接种9 ml NK激活培养基1、1 ml热灭活自体血浆和PBMC (推荐PBMC接种密度为 $1.5-2.5 \times 10^6/\text{ml}$)。前后左右晃动, 放入37℃, 5% CO₂培养箱中培养。注意: 若为冻存PBMC, 建议接种密度为 $2.0-3.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 4) NK完全培养基的配制: 每支NK细胞因子II用1 ml NK细胞无血清培养基溶解, 以1:1000的比例添加至NK细胞无血清培养基中, 混匀备用。(是否加入双抗或者其他抗生素可根据实际实验需要)。
- 5) NK激活培养基2的配制: 取140 ml NK完全培养基, 加入剩余NK细胞因子I, 混匀备用。



- 6) 第3天补液：沿培养瓶侧壁缓慢补加培养基，每瓶补加**18 ml NK激活培养基2**和**2 ml热灭活自体血浆**，每个培养瓶中液体总体积为30 ml。**注意：避免触碰培养瓶底部，切勿吹打细胞，前5天尽量减少计数、观察等操作，避免影响细胞初期生长。**
- 7) 第5天扩瓶培养：将两个T25培养瓶中细胞完全吹打下来，转移到同一个T175瓶中，并补加**95 ml NK激活培养基2**和**5 ml热灭活自体血浆**。
- 8) **NK扩增培养基的配制**：剩余的NK完全培养基，以1000:1的比例添加**NK细胞因子III**，混匀备用。
- 9) 第7天转袋：将T175培养瓶中的细胞完全吹打下来，转移到培养袋中，并补加340 ml **NK扩增培养基**和3.4 ml**热灭活自体血浆**。如血浆量不足，则将剩余血浆全部添加进去。
注意：如细胞培养袋中液体<500 ml，需将培养袋折叠放置，上袋后尽量每天可以摇晃细胞袋，并拍散细胞团，防止细胞增殖过快结团太大。
- 10) 第9天补液：向细胞培养袋补加700 ml **NK扩增培养基**，此时的细胞培养袋完全展开。
- 11) 第11天补液：视细胞生长状态，建议向细胞培养袋补加**NK扩增培养基**800 ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 12) 培养至第14-16天：根据细胞状态进行细胞收获。

参考补液程序 (2 L体系)

时间	试剂	细胞密度(10 ⁶ /ml)	容器	补液体积	总体积	补加血浆量	补加血浆比例
D0	NK激活培养基1	1.5-2.5	T25×2瓶	10 ml×2	10 ml×2	2 ml	10%
D3	NK激活培养基2	1.5-2.5	T25×2瓶	20 ml×2	30 ml×2	4 ml	10%
D5	NK激活培养基2	0.5-1	T175	100 ml	160 ml	5 ml	5%
D7	NK扩增培养基	0.5-1	2.5 L细胞培养袋	340 ml	500 ml	3.4 ml	1%
D9	NK扩增培养基	0.5-1	2.5 L细胞培养袋	700 ml	1200 ml	0 ml	0%
D11	NK扩增培养基	0.5-1	2.5 L细胞培养袋	800 ml	2000 ml	0 ml	0%
D14-D16	收获细胞 (2000 ml)						

注意事项

- 培养基平衡至室温使用，细胞因子组分反复冻融次数不超过三次。
- 前5天尽量减少细胞计数、观察、吹打等操作，避免影响细胞初期生长。
- 自体血浆可用hAB血清或者血浆替代物代替，如若自体血浆不足以参与实验全流程，可至少保证前7天自体血浆的用量。
- 由于样本的差异性，细胞增殖和纯度会存在差异。培养过程中出现细胞过多培养基变黄的情况，可略微调整培养基添加量。
- 换瓶或转袋时，旧培养瓶中残留细胞可在原培养瓶中添加适当新鲜培养基（无需添加血浆），继续培养2-3天后可观察到大量细胞或细胞团已悬浮在培养液中，此时可将这些细胞悬液转移合并到正常体系培养瓶或培养袋中。旧培养瓶中培养2-3天后仍无法脱落的细胞直接丢弃。
- 培养过程中使用的细胞培养瓶均为经过TC处理的培养瓶。
- 尽可能使用大体积的培养袋，促进细胞间的气体交换，防止代谢废物过多影响细胞增殖。如采用1 L培养体系，推荐使用2 L培养袋；采用2 L培养体系，推荐使用2.5 L培养袋。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202506

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

