



产品说明书

新鲜型 NK 细胞培养试剂盒-4L 体系

货号：GD-A2

个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室

WWW.NLAELPCT.COM



产品描述

由个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室精心开发的新鲜型 NK 细胞培养试剂盒，包括了激活、诱导和扩增需要的细胞因子和必要的培养基、培养添加物。

本产品可刺激通过 Ficoll 分离获得的新鲜单个核细胞诱导分化为自然杀伤细胞(NK 细胞)。

本产品仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床、家庭以及其他用途。

试剂盒组成成分

序号	试剂名称	数量
1	FNK-1	1 支
2	FNK-2	1 支
3	FNK-3	4 支
备注	请配合配套的 NK 细胞培养基使用	

使用说明

- 所有工作必须在无菌环境中进行，请遵守严格无菌的工作规范，使用无菌耗材。

诱导用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 FNK-2 置于室温环境解冻至因子完全溶解，轻轻地上下颠倒试剂管以确保试剂混合均匀。
2. 用 70%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁，室温放置数秒使酒精挥发。
3. 在洁净工作台中吸取 140mL 的 NK 培养基。
4. 无菌吸取 FNK-2 加入 140mL 的 NK 培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
5. 轻晃配置好的诱导用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配置完成的培养基于 4° C 保存。

扩增用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 FNK-3 置于室温环境解冻至因子完全溶解，轻轻地上下颠倒试剂管以确保试剂混合均匀。
2. 用 70%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁，室温放置数秒使酒精挥发。
3. 无菌吸取 FNK-3 加入培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
4. 每 900~1000mL 的 NK 培养基加入 1 支 FNK-3。
5. 轻晃配置好的扩增用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配置完成的培养基于 4° C 保存。

操作规程

实验材料

1. 新鲜型 NK 细胞培养试剂盒；
2. 细胞培养瓶（175cm²）；
3. 细胞培养袋；
4. 一次性注射器（60mL、20mL）；
5. DPBS；
6. 淋巴细胞分离液；
7. 0.9%氯化钠注射液。

操作方法

1. 培养瓶包被
 - a) 在 T-175 培养瓶中加入 13mL DPBS。轻轻摇晃，使溶液在培养瓶瓶底扩散，铺满瓶底。
 - b) 加入 1 支 FNK-1，轻晃培养瓶，使因子铺满培养瓶瓶底培养面。
 - c) 37° C 温度条件下静置 2~6 小时，或者 4° C 温度条件下静置 24~72 小时。超过包被时间后不得使用。
2. 单个核细胞分离

- a) 抗凝血分装至离心管内，每管 20~35mL。
 - b) 室温，900g 离心 15min。
 - c) 血浆的灭活处理：
 - i. 吸取血浆到离心管，封口后 56° C 水浴 30min。
 - ii. -20° C 静置 10min。
 - iii. 4° C，1100g 离心 15min。
 - iv. 吸取上清至离心管，4° C 保存备用。
 - d) 用 0.9%氯化钠注射液稀释血细胞沉淀，重悬定容至每管 30mL，吹洗混匀。
 - e) 将混匀的细胞悬液轻柔平铺至装有 15mL Ficoll 的离心管中。
 - f) 室温，600g 离心 15min，缓慢降速。
 - g) 吸取单个核细胞层至离心管，用 0.9%氯化钠注射液定容至 50mL 并混匀。
 - h) 室温，600g 离心 10min。
3. 细胞接种（第 0 天）
- a) 离心后的单个核细胞使用诱导用 NK 培养基重悬并定容至 30mL 后，加入 5mL 灭活血浆。
 - b) 从完成包被的培养瓶中吸出包被液。
 - c) 将重悬的细胞全部接种至培养瓶中，轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO₂ 培养箱中培养。
4. 培养瓶加液（第 3 天）
- a) 往培养瓶中加入 40mL 诱导用 NK 培养基和 5mL 灭活血浆。
 - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO₂ 培养箱中培养。
5. 培养瓶加液（第 5 天）
- a) 往培养瓶中加入 70mL 诱导用 NK 培养基和 10mL 灭活血浆。
 - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO₂ 培养箱中培养。
6. 扩瓶和加液（第 7 天）
- a) 使用移液管吹吸培养基，尽量让贴壁细胞脱落。
 - b) 加入 160 mL 扩增用 NK 培养基和剩余灭活血浆。
 - c) 吹吸混匀后取一半体积细胞悬液接种至 1 个新的培养瓶中。
 - d) 2 个培养瓶轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO₂ 培养箱中培养。
7. 转入细胞培养袋（第 9 天）

- a) 对培养面贴壁的细胞进行轻柔吹洗, 吹洗过程中移液管不可刮蹭培养面。
 - b) 尽量收集贴壁细胞后, 将所有细胞均分并分别转移至 2 个培养袋内。
 - c) 往每个培养袋内加入 150mL 扩增用 NK 培养基。
 - d) 轻柔摇匀, 放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱。
8. 培养袋补液 (第 11 天)
- a) 往每个培养袋内加入 500mL 扩增用 NK 培养基。
 - b) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱。
9. 培养袋补液 (第 13 天)
- a) 往每个培养袋内加入 800mL 扩增用 NK 培养基。
 - b) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。
10. 细胞第 1 次收集 (第 16 天)
- a) 从每个培养袋内收集 1000mL 细胞培养基至离心管内。
 - b) 室温, 500g 离心 8min。
 - c) 吸出上清液后用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。
 - d) 室温, 500g 离心 8min。
 - e) 小心吸出上清液, 用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。
 - f) 室温, 300g 离心 8min。
 - g) 弃去上清, 按照预期用途使用适合的保存液重悬保存细胞。
 - h) 收集后补液:
 - i. 往每个培养袋内加入 400mL 扩增用 NK 培养基。
 - ii. 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。
11. 细胞第 2 次收集 (第 19 天)
- a) 从每个培养袋内收集全部细胞培养基至离心管内。
 - b) 室温, 500g 离心 8min。
 - c) 吸出上清液后用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。
 - d) 室温, 500g 离心 8min。
 - e) 小心吸出上清液, 用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。
 - f) 室温, 300g 离心 8min。

g) 弃去上清，按照预期用途使用适合的保存液重悬保存细胞。

注意事项

1. 血液样本体积（不含抗凝剂）建议不少于 50mL。
2. 在诱导培养期间请严格按照说明书进行操作，在扩瓶前加液时轻柔操作，不要试图对细胞（特别是贴壁的细胞）进行吹吸操作。
3. 第 7 天及以后建议在操作前取样计数，如细胞密度低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 时推荐延迟 1-2 天进行操作。
4. 试剂盒内的因子请在 -20°C 及以下温度保存时，有效期为 1 年。
5. 试剂盒内请在有效期内使用。
6. 本说明书会随着研究的进步持续更新，最新的说明书请关注“个性化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室”公众号获取。