



产品说明书

复苏型 NK 细胞培养试剂盒-4L 体系

货号：GD-B2

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复苏型 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 分离获得并经过冻存的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	CUNK-1	1 支
2	CUNK-2	1 支
3	CUNK-3	4 支
4	CUNK-4	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。

NK 培养基组分添加

1. 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。
2. 在洁净工作台中吸取 1 支培养基添加物加入到 NK 培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
3. 每 1000mL 培养基加入 1 支培养基添加物。
4. 轻晃配制好的 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。

诱导用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 CUNK-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 40mL 的 NK 培养基。
4. 无菌吸取 CUNK-2 加入 40mL 的 NK 培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
5. 轻晃配制好的诱导用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配制完成的培养基于 4° C 保存。

扩增用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 CUNK-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 CUNK-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 CUNK-3。
5. 轻晃配制好的扩增用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配制完成的培养基于 4° C 保存。

操作规程

实验材料

1. 复苏型 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. 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 CUNK-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. 细胞接种（第 0 天）
 - a) 复苏后的单个核细胞经过洗涤后，使用诱导用 NK 培养基重悬并定容至 20mL 后，加入 1 支 CUNK-4。
 - 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。
3. 培养瓶加液（第 3 天）
 - a) 往培养瓶中加入 20mL 诱导用 NK 培养基和 1 支 CUNK-4。
 - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO₂ 培养箱中培养。
4. 培养瓶加液（第 5 天）
 - a) 往培养瓶中加入 40mL 扩增用 NK 培养基和 2 支 CUNK-4。
 - 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 7 天）
 - a) 往每个培养瓶内加入 120mL 扩增用 NK 培养基。
 - b) 轻柔摇匀，放入 37° C，5%CO₂ 培养箱。
6. 转入 2 个培养瓶（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) 培养瓶收集所有细胞并平均转移至 2 个培养瓶中。
 - c) 往每个培养瓶内加入 100mL 扩增用 NK 培养基。
 - d) 放入 37° C，5%CO₂ 培养箱。
7. 转入 2 个培养袋中补液（第 11 天）
 - a) 对 2 个培养瓶贴壁的细胞进行轻柔吹洗，尽量将贴壁细胞完全吹下，分别转入

- 2 个细胞培养袋中。
- b) 往每个培养袋内加入 200mL 扩增用 NK 培养基。
 - c) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱。
 - d) 在培养袋 1/2 处折叠培养袋, 仅使用一半的培养袋体积进行细胞培养。
8. 培养袋补液 (第 14 天)
- a) 往每个培养袋内加入 400mL 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。
 - c) 完全展开培养袋平铺于培养箱中。
9. 培养袋补液 (第 16 天)
- a) 往每个培养袋内加入 600mL 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. 培养袋补液 (第 19 天)
- a) 往每个培养袋内加入 600mL 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。
11. 细胞收集 (第 22 天)
- a) 将培养袋内细胞培养基全部收集至离心管内。
 - 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. 种瓶的单个核细胞冻存前推荐不少于 4×10^7 个, LYM/WBC 比例 $\geq 60\%$ 。
- 2. 在诱导培养期间请严格按照说明书进行操作, 不要试图对细胞 (特别是贴壁的细胞) 进行吹吸操作, 诱导培养期加液时轻柔操作。
- 3. 第 7 天及以后建议在操作前取样计数观测细胞生长状况, 第 11 天转袋如细胞密度

低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 时推荐延迟 1-2 天再进行转袋；后续补液前取样计数，如细胞密度低于 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 时推荐延迟 1-2 天进行补液。

4. 试剂盒内的因子请在 -20°C 及以下温度保存，有效期为 1 年。
5. 试剂盒内请在有效期内使用。
6. 本说明书随着研究的进步会持续更新，最新的说明书请关注“个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室”公众号获取。