

NK 细胞扩增试剂-CB 使用说明书

试剂组成

组成	货号	试剂名称	规格	数量	储存条件
NK 细胞扩增试剂	MDL2005	NK 细胞扩增试剂 CB FC-I	2ml	1	-80℃或液氮
		NK 细胞扩增试剂 CB FC-II	4ml	1	-80℃或液氮
		培养基补充剂(无动物源成分) 适用脐血 NK 培养	40ml	1	-20℃以下

产品描述

本套装中 FC 可用于高效扩增脐血来源的 NK 细胞。配合培养基补充剂，在无血清培养基条件下进行 NK 细胞的体外扩增，培养两周左右 NK 细胞纯度（ $CD_3^+CD_{(16+56)}^+$ 细胞）在 50-99%之间，扩增倍数（相对于起始细胞数量）可达 200 倍。

试剂使用

- 1、NK 细胞扩增试剂 CB -FC I/II 需-80℃或液氮保存，使用前需要 37℃水浴复苏，并用 PBS 或培养基洗一次，1200rpm，离心 3min，弃上清，用 2~3ml 培养基重悬，备用；本试剂解冻后应在 4h 内使用，仅可单次使用，不可再次冻融；
- 2、NK 培养基配制:GT-T551H3 培养基+终浓度 200u/ml IL-2,此培养基用于整个 NK 细胞培养过程；
- 3、不可用脐血自体血浆，需要培养基补充剂代替脐血自体血浆；
- 4、每次补液前需要将培养基恢复至室温；
- 5、配制好的培养基中含有 IL-2，溶解的 IL-2 有时效性，超过两周需要重新补加。

操作方法:

- 1、Day 0，分离单核细胞并计数，培养基将细胞浓度调整到 0.5×10^6 cells/ml 左右，其中内含 10%培养基补充剂，加入重悬的 NK 细胞扩增试剂 CB FC- I 并混匀，以 30ml 脐血为例，通常 BMC 在 $3 \sim 5 \times 10^7$ cells，可以将细胞悬液的体积控制在 60~100ml 左右；然后细胞悬液加入 1~2 个 T75 cm² 培养瓶，5%CO₂，37°培养；
- 3、Day 3，离心换液，将细胞吹打混匀，放入离心管中，1200rpm，离心 5min，弃上清，用等体积培养基重悬细胞后，加入到 T75 cm² 培养瓶（不换瓶），添加 5%培养基补充剂，5%CO₂，37℃培养；

- 4、Day 4, 根据细胞状态, 补加 2~4 倍培养基, 并添加 3%培养基补充剂;
- 5、Day 6, 根据细胞状态, 补加 2~4 倍培养基, 并添加 2%培养基补充剂;
- 6、Day 7 添加二次刺激, 取 4ml NK 细胞扩增试剂 CB FC-II, 处理方法参见试剂使用-1, 然后添加到细胞培养液中, 并补加 2~4 倍的培养基, 并添加培养基补充剂;
- 7、以后每天观察细胞状态, 根据细胞生长情况补加培养基;
- 8、培养至 11~12 天, 根据细胞体积和状态, 收集细胞。

细胞培养操作表格

本表格仅供参考, 由于样本有差异, 根据细胞状态补液体积可以适当调整。

操作	培养时间	使用试剂	补加培养基 体积	补加培养基 补充剂	总体积	处理方法
接种	Day 0	NK 细胞扩增试剂 CB FC-I	54	6	60	接种细胞、添加 NK 试剂-FC I
离心换液	Day 3	NK 培养基	57	3	60	离心换液
补液	Day 4	NK 培养基	每袋约 70ml	6	200	装袋, 分成两袋, 每袋 100ml
补液	Day 6	NK 培养基	每袋约 100ml	8	400	根据状态调整体积
二次刺激	Day 7	NK 细胞扩增试剂 CB FC-II	每袋约 200ml	16	800	根据状态调整体积
补液	Day 9	NK 培养基	每袋约 400ml	全部加入	1600	根据状态调整体积
收获/补液	Day 11	NK 培养基	每袋约 400ml	//	//	根据需要进行 1-2
收获	Day 13	NK 培养基		//	//	次收获

注意事项:

- 1、培养过程中, 尤其是培养初期, 细胞接种浓度应在 0.5×10^6 cells/ml 左右。
- 2、一套 NK 扩增试剂建议使用体积为 60~100ml, 如果培养体积大建议增加试剂用量。
- 3、培养基补充剂使用: 不可用脐血自体血浆, 需用培养基补充剂替代; 培养初期, 添加培养基补充剂有利于细胞的快速增殖, 建议接种细胞时, 添加 10%的培养基补充剂。
- 4、灵活补液: 培养基有明显变色且细胞团数量多, 可以提前补液; 细胞扩增状态不理想时, 可推迟补液; 补加培养基时, 体积可以根据细胞的数量和状态作相应的调整通常保持细胞密度在 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml 之间。
- 5、培养袋使用: 如果体积较少, 将细胞转移到培养袋前, 可用磁铁条在培养袋上分区进行培养。
- 6、细胞团控制: 当细胞团较大时, 可通过上下拍打细胞袋的方法处理, 防止中间细胞因营养缺失凋亡。