

人 NK 细胞激活扩增试剂盒使用说明书

产品名称：人 NK 细胞激活扩增试剂盒

Human Natural Killer Cell Activation and Expansion Kit

货号：QS-N001

产品组成及储存条件：

名称	规格	数量	储存条件	有效期
NK-Activation 100X	500ul/支	1 支	-20°C	12 个月
NK-Expansion 100X	500ul/支	1 支	-20°C	12 个月

产品概述：

人 NK 细胞激活扩增试剂盒（Human Natural Killer Cell Activation and Expansion Kit），是一款适用于人外周血或脐血来源的单个核细胞中 NK 细胞的体外激活和扩增的科研试剂，无需提前包被培养瓶，现用现加，操作简单。NK 细胞约占外周血淋巴细胞中的 5%~30%，使用本产品对 NK 细胞进行体外激活和扩增，可在 15 天内使大多数样本中 NK 细胞扩增 500~1000 倍且 CD3-CD16+CD56+ 细胞比例可达 90% 以上；经本公司多次极限实验验证，在营养充足的情况下，NK 细胞可连续培养至 28 天以上，并保持较高的细胞活性，扩增倍数可达 10000 倍以上。本产品添加有多种细胞因子促进 NK 存活、增殖和成熟，使扩增出的 NK 细胞，具有纯度高、活性高、细胞毒性强等特点。

操作方法：

一、单个核细胞的提取

以下操作以 100ml 自体外周血提取单个核细胞操作为例，**请勿使用 EDTA 抗凝的血液样本。**

自备试剂：DPBS、Ficoll-Paque PLUS 分离液、X-VIVO 15 培养基。

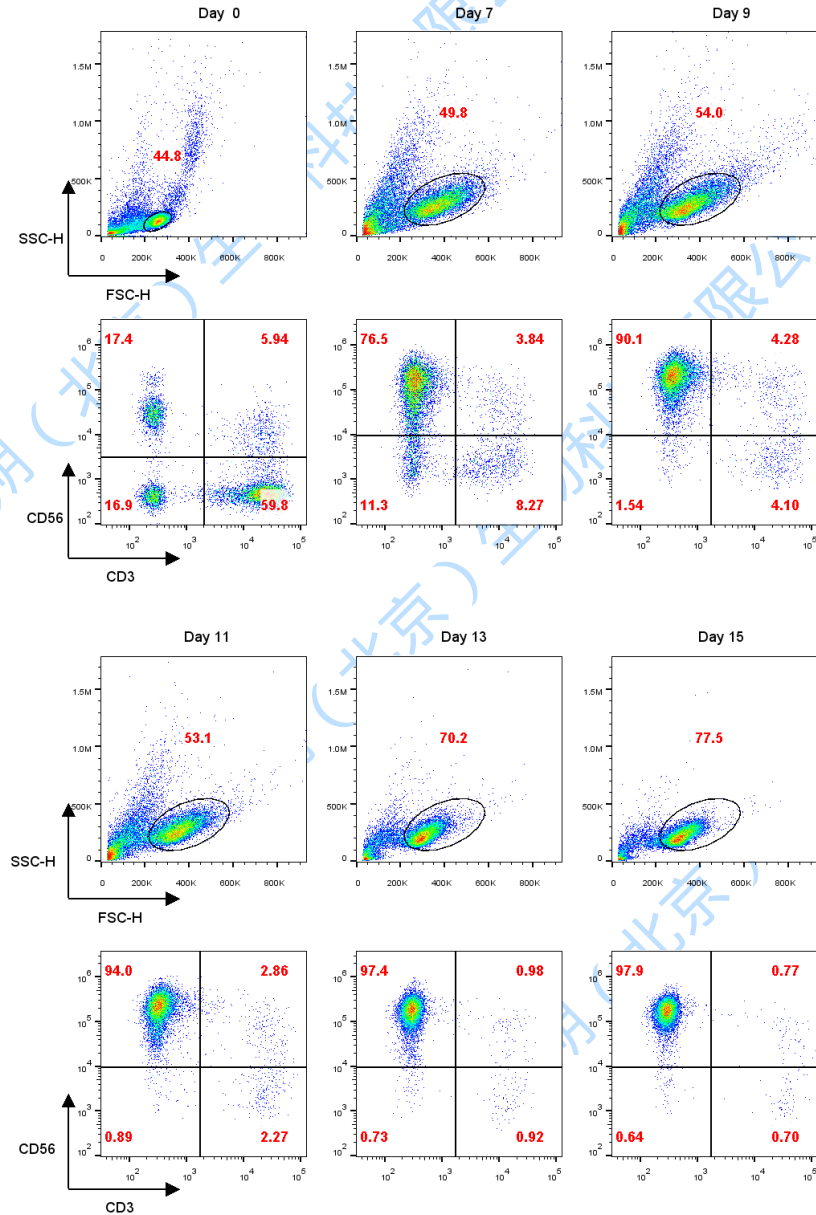
1. 将装有血样的真空采血管，置于合适的离心管架，表面消毒后，移入生物安全柜；
2. 打开管盖，用电动移液器将外周血收集于两个 50ml 离心管中，室温 1100g 离心 10 min；
3. 用移液器吸取最上层血浆至一支新的 50ml 离心管中，56℃ 水浴热灭活 30 min；热灭活后，擦干离心管表面水分，1600g 离心 10min 中，将血浆上清转至一支新的离心管中，做好标记；
4. 在移除血浆后的血细胞沉淀管中加入室温 DPBS 至 50ml 并混匀；
5. 取 4 个 50ml 离心管，每管加入 15ml Ficoll 分离液，将 25ml 稀释后的血细胞悬液用移液器缓慢加载到 Ficoll 层上；
6. 室温 900g，离心 20 min（中等加速，刹车 OFF）；
7. 检查离心后情况，正常情况下应共有四层，从上到下分别为血浆、白膜层、Ficoll、粒细胞和红细沉淀。小心吸取白膜层细胞转移至 2 支新的离心管中，加入室温 DPBS 至 50ml，混匀，500g 离心 10min；
8. 倾去上清，将各离心管细胞沉淀振荡开后用 10ml D-PBS 悬浮合并为一管，补 D-PBS 至 50ml，混匀，细胞计数，室温 300g，离心 10min；（注：倾去上清时需小心，由于液体中含有 Ficoll 成分，细胞在管底并不牢固）
9. 倾去上清，将各离心管细胞沉淀振荡开后用复温的 X-VIVO 15 培养基将细胞沉淀重悬并定容为 $2\sim 4\times 10^6/\text{ml}$ 。（注：本试剂盒适配过市面上多种培养基，推荐使用 X-VIVO 15，使用前请 37℃ 水浴复温半小时）

二、NK 细胞的培养

自备试剂：X-VIVO15 培养基、IL-2（培养基添加前一定要复温，推荐 37°C 水浴半小时）

1. Day 0，将已定容为 $2\sim 4\times 10^6$ cells/ml 的 PBMC 悬液接种至 T175 瓶中，根据细胞悬液体积加入 **NK-Activation 100X**，使其终浓度为 1X，轻轻摇匀，放置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中；
（注：第 0 天不添加自体血浆，如果细胞悬液体积小于 20ml 请接种于 T75 培养瓶中，培养瓶均为常规 TC 处理培养瓶即可）
2. 24h 后（Day 1），添加 **NK-Expansion 100X**，使其终浓度为 1X，并补加 5% 自体血清；（注：没有自体血清可补加 5% 血清替代物或人 AB 血清）
3. 72h 后（Day 3），在培养瓶中补加细胞悬液等体积的含 IL-2 1000IU/ml 的 X-VIVO 15 完全培养基；（注：X-VIVO 15 完全培养基指含有 5% 自体血清的培养基，）
4. Day 6，在培养瓶中补加细胞悬液等体积的含 IL-2 1000IU/ml 的 X-VIVO 15 完全培养基；（注：如果此时细胞悬液已超出培养瓶最大容量，可进行转袋操作，瓶底贴壁细胞用移液管吹打或细胞刮刮落后，一同转入袋中）
5. 第 6 天以后，细胞会进入快速扩增阶段，由实验操作者自行把握等体积补液时间，补液培养基仍为含 IL-2 1000IU/ml 的 X-VIVO 15，补液时机为细胞悬液变为橙黄，镜下观察袋底有大量密集细胞或细胞团；（注：补液时间一般为每 1~3 天，自体血清按照 5% 添加，加完即止，推荐补液前将袋中细胞轻轻摇匀后取样计数，补液后细胞浓度不低于 10^6 /ml）
6. 根据细胞悬液体积进行分袋操作，每个培养袋 500ml 细胞原液加入 500ml 含 IL-2 1000IU/ml 的 X-VIVO 15 新鲜培养基；（注：推荐补液前细胞计数，根据细胞浓度计算补液体积，补液后细胞浓度不低于 10^6 /ml）
7. Day 13 取样做流式检测；
8. 培养至目标细胞数目时，收获 NK 细胞；（注：1 升生长良好的细胞悬液约含细胞数目为 3×10^9 ）

【例】



经本产品培养 15 天的细胞的一般表型变化如上图所示，在培养第 7~11 天可以看到大量非 NK 细胞凋亡（FSC-H 减小 SSC-H 增大），NK 细胞比例逐渐增多；在培养第 13 后 NK 细胞逐渐均一成熟。

【注意事项】

1. 本产品仅限科学研究使用，不用于临床诊断和治疗；
2. 由于不同样本间差异，极少数起始 NK 数目小于 5%（单个核细胞）且 NKT 数目较多的样本培养后 NK 阳性率可能会低于 90%；
3. 本产品应避免反复冻融；

【生产企业】

企业名称：启朔（北京）生物科技有限公司
电 话：400-068-5660