

**TBD**[www.tbdsience.com](http://www.tbdsience.com)

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

## 高效 NK 细胞体外活化扩增试剂盒说明书

### 冻存细胞培养方案（2L 体系）

#### 【试剂材料清单】

##### ▶ 试剂盒组份

产品货号：UCB2024GOLD

序号	名称	规格	保存温度
1	高效 NK-1	1 支	-20℃至-80℃ 避光保存
2	高效 NK-2	1 支	
3	高效 NK-3	1 支	
4	高效 NK-4	1 支	

##### ▶ 配套试剂及耗材（根据实验需求自行选择搭配）

序号	名称	货号	规格	保存温度
1	样本密度分离液（医用级）	HY2015-100	100ml /瓶	RT
2	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L /瓶	2-8℃ 避光保存
3	PBS	PB2004Y	500ml /瓶	RT
4	PBMC 高效离心管（50ml）	601001	20 支/盒	RT
5	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	RT
6	细胞保存液	TBD798	100ml /瓶	2-8℃ 避光保存
7	高效 NK-3 (扩增体系必须因子, 单独采购)	UCB2024GOLD-NK-3	支	2-8℃ 避光保存

## 冻存 P/CBMC 初始投入方案

经过冻存复苏的 PBMC/P/CBMC，细胞结构完整性、活性、活力有不同程度受损，一些样本 CD3- 56+ 16+比例在一定程度上有所降低。在此状况下，冻存 PBMC/P/CBMC 的 NK 细胞体外培养需要更长的活化增殖周期。其效率低于新鲜外周血及脐带血，三者之间的活化增殖效率关系为：新鲜健康人外周血 > 新鲜脐带血 > 冻存 PBMC/P/CBMC。

建议客户在实验开始前，将复苏后的细胞悬液留出 1ml 进行流式检测，记录 NK 细胞比例（CD3- 56+ 16+）、细胞数量、细胞活率。并参照下表进行初始细胞投入。

样本	NK 细胞 (CD3-56+16+) 占淋巴细胞比例	细胞活率	投入 P/CBMC 总量(单位:个)	其中 NK 细胞 (CD3-56+16+) 数量 (单位:个)
冻存 C/PBMC	冻存 CBMC 3%-10%	90%以上	<b>6500 万</b> 及以上	195 万及以上
	冻存 PBMC 5%-30% (或无流式细胞仪)	90%以下	<b>1 亿</b> 及以上	300 万及以上

## 第一部分 培养瓶的包被

1. 取一个 T175 培养瓶(TC 处理培养瓶), 向瓶中加入 11ml 无菌 PBS 及一整支**高效 NK-1**, 请**充分摇匀后铺满整个瓶子底部**;
2. 将上述 T175 培养瓶拧紧瓶盖, 放入 37℃ 培养箱静置 2 小时, 或 4℃ 环境过夜静置 (约 12-20 小时);
3. 将包被好的培养瓶置于超净工作台内, 将瓶中的包被液直接倾倒弃去, **注意倾倒前不可来回摇晃包被液, 不要反复冲刷包被层, 不需要重复清洗瓶底, 请直接弃去包被液**。此时 T175 培养瓶包被完成。

## 第二部分 培养基的配制

### ▷ 活化培养基的配制

1. 取 1 瓶免疫细胞无血清培养基 (产品货号: ANDL-TBD-G), 无菌分装出 500ml 置于无菌试剂瓶 (或 T175 及以上规格的细胞培养瓶中), 剩余 500ml 放置于 4℃ 环境下保存;
2. 向分装出的 500ml 免疫细胞无血清培养基中, 加入一整支**高效 NK-2**, 即为活化培养基。

### ▷ 增殖培养基的配制

1. 取出保存于 4℃ 环境中的 500ml 免疫细胞无血清培养基, 及另外一整瓶 1L 免疫细胞无血清培养基, 共计 1500ml;
2. 将 1500ml 免疫细胞无血清培养基, 平均分至两个试剂瓶中, 每瓶 750ml;
3. 取其中 1 瓶 750ml 免疫细胞无血清培养基, 加入 500ul **高效 NK-3** 摇匀即为增殖培养基。剩余 500ul 高效 NK-3 放置于 4℃ 环境下保存 (可保存 20 天左右)。使用时现用现配, 增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶 750ml 增殖培养基, 用完后再配制第二瓶 750ml 增殖培养基。

### 第三部分 PBMC/P/CBMC 的复苏

1. 将冻存细胞从液氮罐中取出，迅速转移至 37℃ 水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管，直到剩余少量细胞还处于结冰状态；
2. 从水浴中取出冻存管，用 70% 的酒精或异丙醇擦拭除菌；
3. 用 2 mL 的血清移液管把细胞悬液转移到一个 50 mL 的锥形试管；
4. 缓慢加入 35 mL 的 PBS 或生理盐水，轻轻混匀；
5. 室温环境 300 g 离心 5 分钟；
6. 吸取上清液并弃去，不要吸取到底部细胞沉淀；
7. 重复洗涤一次；
8. 吸取上清液并弃去，不要吸取到底部细胞沉淀，减少损失；



TBD

www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

## 高效 NK 细胞的活化及培养流程（2L 体系）

2L 体系培养建议客户采购以下配套试剂耗材：

序号	名称	货号	规格	建议采购数量
1	高效 NK 细胞体外活化扩增试剂盒	UCB2024GOLD	4 支/KIT	1KIT
2	样本密度分离液（医用级）	HY2015-100	100ml /瓶	1 瓶
3	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L /瓶	2 瓶
4	PBS	PB2004Y	500ml /瓶	1 瓶
5	PBMC 高效离心管（50ml）	601001	20 支/盒	1 盒
6	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	1 个
7	细胞保存液	TBD798	100ml /瓶	1 瓶

### 第 0 天：

#### 血浆的灭活步骤：

- ① 首先将含血浆的离心管置于水浴锅中 56℃ 静置 30min；
- ② 接着放置于-20℃环境下静置 10min；
- ③ 最后 1200g，离心 15min；
- ④ 保存离心后的上清至一支新的无菌离心管中，弃去底部沉淀；
- ⑤ 取出第 0 天所需 10ml 血浆备用；
- ⑥ 剩余血浆建议在第 3 天补液前进行 3 次-80℃ ~ 37℃ 环境的反复冻融；3 次冻融后 1200g，离心 15min；弃去底部沉淀，于 4℃ 保存离心后的灭活血浆。（此步骤目的为尽量多的去除血浆中残留的纤维蛋白原，客户可根据自身需求选择性进行。）

1. 复苏后的 P/CBMC 用**活化培养基** 配制成细胞悬液 **35ml**，加入一整支“**高效 NK-4**”、加入 **10ml 灭活血浆**，将上述所有液体转移至包被后的 T175 培养瓶中，注意不要直接冲刷包被层，请温和摇动液面至细胞液铺满整个培养瓶底部。置于饱和湿度、37℃、5.0% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 小时，期间不要移动培养瓶。

操作注意：...

1. 建议接种前计数，记录 P/CBMC 投入数量，以便后续实验步骤的分析调整；
2. 脐带血 P/CBMC 建议接种密度为  $2-3 \times 10^6$  个/ml，如复苏后细胞数少，则相对应减少培养基的量，但血浆及活化因子添加量不变；
3. 培养期间培养瓶盖需拧松至可透气且不掉落的状况，约 0.5-1 圈（无论使用的是否为透气瓶，均拧松瓶盖。）
4. 建议使用纯度为 99.99% CO<sub>2</sub> 气体。

**第 3 天：**

加入 **40ml 活化培养基**，加入 **10ml 灭活血浆**。

**第 6 天：**

加入 **75ml 活化培养基**，加入 **5ml 灭活血浆**。

**第 9 天：（开始计数）**

将培养瓶中贴壁的细胞充分吹打下来，转移到 1 个细胞培养袋内（产品货号：N2500TBD）

加入 **5ml 灭活血浆**，视细胞生长状态（计数），建议向培养袋补加 **350ml 活化培养基**。

## 第 12 天:

视细胞生长状态 (计数), 建议向培养袋补加 **500ml 增殖培养基**, 加入**剩余灭活血浆**。

请客户于培养的第 9 天及后续补液日仔细阅读以下操作释义:

### 一. NK 细胞培养中判断补液的标准是周期还是浓度:

NK 培养一般来说是按照浓度进行补液, 由于个体差异问题, 每个样本生长状况不可能 100% 相同, 按照天数来补液会有一些不准确, 所以按照浓度是相对稳妥的。添加培养基的时间不一定要严格按照后期时间进行, 根据具体情况具体分析, 确保细胞已经活化成功, 呈现聚团生长的情况, 细胞数量有增殖。在补加培养基后, 细胞密度至少维持在  $1.5-2 \times 10^6$  个/ml, 有利于细胞的生长。

### 二. 关于培养密度及何时补液的问题:

1. 冻存细胞 NK 培养的最佳密度为 150 万个/ml~300 万个/ml。
2. 当细胞密度增殖到 200 万-300 万个/ml 之间, 根据公式: 当前细胞总量(单位个)  $\div$  150 万个 - 现有体积 (ml) = 本次需补加培养基体积 (ml), 将补液后的细胞密度控制在 150-200 万个/ml。一般每隔 72 小时计数补液一次, 直到培养基完全用光。
3. 如计数后发现当前细胞密度达不到 200 万个/ml, 建议 72 小时后再计数, 细胞状态不好或有凋亡现象, 立即补加 5ml 灭活人脐带血血浆。

### 三. 关于 NK 细胞在培养过程中的结团问题:

1. 一般情况下, NK 细胞培养期间有结团现象是正常的, 由于血浆中有不可避免纤维蛋白存



**TBD**

[www.tbdsience.com](http://www.tbdsience.com)

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

在，容易造成细胞聚团或呈现絮状。经过反复吹打或摇晃可散开呈小团状为正常现象。

2. 使用的脐带血不够新鲜，有肉眼可见或不可见的凝血现象；
3. 密度过大，细胞在培养至第 11-13 天左右，细胞增殖速度达到峰值，DAY11-DAY13 左右容易产生细胞絮状物，可稍用力来回摇晃培养袋数次至絮状物散开；
4. 染菌，细胞死亡，纤维相互交缠；
5. 未及时补液，细胞缺乏营养，死细胞抱团。

#### 四. 为什么我的 NK 细胞长的慢甚至不长？

1. NK 细胞占淋巴细胞比例，若低于 5%，细胞呈缓慢生长或停滞增殖状态；
2. 供血人的身体情况是否健康，无急慢性病，无不良生活习惯，无特殊身体状况；
3. 血液新鲜度（以外周血离体 4 小时为判断，4 小时内为新鲜，4 小时以上为不新鲜）；
4. 试剂盒、培养液、分离液的保存温度各不相同，请放置在适宜环境下；
5. 冻存血 P/CBMC 投入密度需达标，至少为 150 万个/ml，推荐为 150 万-300 万个/ml 之间；
6. 补液时机准确，培养液呈现橘色，且计数达标后进行补液，过早或过多补液都会造成细胞不增殖或者少增殖；
7. 接种前 3 天，不要移动培养瓶；
8. 培养环境要稳定，温湿度适宜，CO<sub>2</sub> 气体纯度 99.99% 最佳，非必要不反复开关门。
9. 不论使用的是否为透气培养瓶，都要拧松瓶盖进行气体交换，只依靠透气膜的交换是远远不够的。

**第 15 天:**

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基 500ml**。

**第 18 天:**

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基 500ml**。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

**第 20 天:**

收集 NK 细胞悬液 2000ml, 400g×10min 离心后弃去上清液, 250ml 离心管集 2 管每管生理盐水 200ml 洗涤 (400g×10min) 1 次, 再用 50ml 离心管生理盐水 100ml 洗涤 (400g×10min) 1 次, 按照 200ml 生理盐水+ 8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞, 封装好后送至使用部门, 同时留样封存以备日后检测。

**【注意事项】**

1. 使用前请仔细阅读本试剂盒说明书, 并严格按照说明书执行操作。
2. 本试剂盒必须按规定温度保存, 不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻, 并充分混匀, 不可剧烈震荡。
3. 可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。