

人II型NK细胞高效扩增试剂盒(PBMC起始)

使用说明书

【产品名称】

中文名称：人II-NK细胞高效扩增试剂盒(PBMC起始)
英文名称：Human II-NK cell robust expansion kit
货号：91-02-0104

【包装规格】 2L/套

【试剂盒组成】

本试剂盒无配备 IL-2，客户需自行购买添加。

成份名称	物理性状	规格	数量
NK-I	无色透明液体	125μL/支	1支
NK-II	无色透明液体	300μL/支	1支
NK-III	白色固体粉末	500mg/支	1支
NK-H	无色透明液体	200μL/支	1支
NK-IV培养基	红色澄清液体	1L/瓶	2瓶

【样本类型】

适用于从人新鲜外周血、新鲜脐血、浓缩白细胞来源的单个核细胞以及冻存的外周血或脐血源单个核细胞在体外扩增成高毒性NK细胞。

【产品简介】

NK细胞是人体免疫的第一道防线，具有非限制性杀伤的特点，如何发挥NK细胞的免疫作用从而治疗肿瘤等疾病是一个重要的课题。因为NK细胞仅占外周血的5-10%，细胞数量的稀少往往是制约研究的一个重要原因。本产品用于从单个核细胞(MNC)在体外高效扩增成高毒性NK细胞，具有扩增效率高，目的细胞百分比高，NK细胞毒性高的特点。

【贮藏与有效期】

试剂盒中NK-I，NK-II，NK-III，NK-H及NK-IV均置于2-8℃保存。有效期为12个月。
生产日期和有效期：见标签。

苏州欣协生物科技有限公司

电话：400-863-1188 网址：www.xinxiebio.com 邮箱：info@szxxbio.com

【操作步骤】

一、血浆的提取与保存

- ✧ 禁止使用EDTA抗凝的血样，因为EDTA会极大影响NK细胞的激活与增殖。
- ✧ 所取血样最好不超过12小时，因为时间越长，所提取的PBMC中杂细胞越多，且PBMC的活性会降低。

1. 将取到的外周血置于50mL离心管中，室温下650g，离心15min。
2. 取上层黄色血浆部分于新的50mL离心管中(下层为血液细胞成分，用于后续单个核细胞的提取)。
3. 将血浆置于56℃ 水浴锅中灭活 30min。
4. 血浆灭活完毕后，可见血浆呈现浑浊状，900g，离心10min。
5. 取上清，于-20℃冷冻15min。
6. 冷冻完毕后，再次900g，离心10min，取上清，于4℃保存待用。

二、单个核细胞的提取

1. 取血浆提取步骤的下层红色细胞沉淀，加入生理盐水或PBS至原体积。
 2. 取2支50mL离心管，分别加入15mL淋巴细胞分离液，并将步骤1中的稀释血液分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层。
- ✧ 铺加血样时建议速度适中，尤其是刚开始时的铺加，避免破坏淋巴细胞分离液与血样的界面。
3. 室温下，800g离心20min(无闸减速)。
 4. 离心后，离心管中样品由上到下分为4层：血浆层-白膜层-人淋巴细胞分离液层-红细胞与粒细胞的沉淀。分别小心吸取白膜层及其以下约一半的液体于新的离心管中，并加入生理盐水或PBS至40mL，混匀，300g离心10min。
 5. 弃上清，沉淀再次用40mL的生理盐水或PBS 重悬，300g离心10min。
- ✧ 对于血小板较多的样本可重复1-2次步骤5。
6. 弃上清，沉淀少许NK-IV培养基重悬，合并，取部分细胞悬液计数，备用。

三、单个核细胞接种与补液

1. T75瓶包被

将7mLPBS加入到T75细胞培养瓶中，再将NK-I加入到T75瓶中，充分混匀后，将细胞培养瓶水平静置于二氧化碳培养箱37℃孵育2h(不能低于1h)。孵育完毕后，吸去包被液，再用10mLPBS轻柔摇晃洗涤培养瓶，弃去清洗液待用。

- ✧ 细胞培养瓶必须经TC处理，严禁使用未经TC处理的培养瓶以及经过特殊处理，专用于干细胞培养的培养瓶。
- ✧ 建议采用平底的培养瓶，而非斜肩的培养瓶，以增加初始细胞的诱导比例。
- ✧ 包被培养瓶时要水平放置，并要求包被液完全覆盖培养瓶底面。

苏州欣协生物科技有限公司

电话：400-863-1188

网址：www.xinxiebio.com

邮箱：info@szxxbio.com

✧ 若包被瓶未能及时使用，可将培养瓶用封口膜封口，置于4℃保存2天。

2. 第0天 配制50mLNK细胞完全培养基

NK-IV培养基45mL，10%已热灭活的自体血浆(5mL)，NK-II300μL，NK-III250mg(NK-III 为每支500mg，用1mL NK-IV培养基溶解，取一半用于本试剂盒)以及IL-2(完全培养基中IL-2终浓度为 1000IU/mL)，将制备好的单个核细胞(MNC)按1-1.5M cells/mL的细胞密度接种于已包被的含有50mLNK细胞完全培养基的T75瓶中。

✧ 每支IL-2使用1mLNK-IV培养基溶解后，可存于2-8℃冰箱，存放时间不超过两周。建议将IL-2溶解后分装于无菌试剂管后保存于-20℃冰箱，使用时溶解即可，注意不要反复冻融，且不可使用长期置于2-8℃的IL-2，否则将严重影响本试剂盒的扩增效果。

✧ 在细胞接种后与第3天补液之前的这段时间内，尽可能不要移动培养瓶，以免使其受到温度变动，震荡等物理因素的干扰。

✧ NK-IV在使用前，需先将其室温平衡30min以上，切勿将培养基直接从冰箱中拿出使用，否则可能导致细胞出现应激反应。

3. 第3天(3×24h)

补加NK-IV培养基95mL，5%已热灭活的自体血浆(5mL)以及IL-2(IL-2终浓度为1000IU/mL)，转入细胞培养袋，此时培养袋含150mL培养基。

✧ 为使更多的细胞转入到培养袋中，可先将T-75瓶中的细胞吹打均匀，全部转入培养袋中，再用部分新鲜配制的培养液润洗培养瓶，并再次转入培养袋中，最后补齐培养液即可。

4. 第5天

往培养袋补加NK-IV培养基150mL，1%已热灭活的自体血浆1.5mL以及IL-2(IL-2终浓度为1000IU/mL)，此时袋子含300mL培养液。

5. 第7天

往培养袋补加NK-IV培养基300mL，剩余的所有自体热灭活血浆以及IL-2(IL-2终浓度为1000IU/mL)，然后分成两袋，此时每个袋子含300mL培养液。

6. 第9天

分别往每个培养袋补加NK-IV培养基300mL，NK-H 100μL以及IL-2(IL-2终浓度为 1000IU/mL)，此时每个袋子含600mL培养液。

✧ 在NK-H随培养液补充进培养袋后，轻轻颠倒混匀培养袋。

7. 第11天，分别往每个培养袋补加NK-IV培养基400mL以及IL-2(IL-2终浓度为1000IU/mL)，此时每个袋子含 1000mL培养液。

8. 第13天或14天，收获高毒性NK细胞。

苏州欣协生物科技有限公司

电话：400-863-1188

网址：www.xinxiebio.com

邮箱：info@szxxbio.com

【注意事项】

1. 使用本试剂盒时，可先将NK-I，NK-II及NK-H试剂管低速离心(如1000g/min 离心1min等)，确保试剂足量。
2. 由于样本之间的差异性，在按上述说明操作时，可根据具体细胞生长状态，调整补液时间。
3. 在使用本试剂盒时，由于样本之间的差异性，每个样本的细胞长速与诱导率存在差异。

【产品性能指标】

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

本产品仅限科学研究使用，不用于临床诊断与治疗。



苏州欣协生物科技有限公司

电话: 400-863-1188

网址: www.xinxiebio.com

邮箱: info@szxxbio.com