

ncKnight® NK 扩增因子试剂盒

操作使用说明

一、产品简介

ncKnight® NK 扩增因子试剂盒是首宁生物科技有限公司自主开发,用于人类自然杀伤细胞(NK)扩增培养的纯因子培养体系,可实现人外周血和脐带血来源 NK 细胞的高效扩增。

二、产品信息

表 1: ncKnight® NK 扩增因子试剂盒-产品说明

产品信息	货号	规格	数量	储存条件
ncKnight® NK 扩增因子试剂盒-包含	SN-03-0030	1 Kit	1	
ncKnight® NK Medium Basal Medium	SN-03-0022	1000 mL	2	2-8 °C
ncKnight® NK Medium Supplement	SN-03-0021	40 mL	2	-80°C 至 -20°C
ncKnight® NK 扩增因子 A	SN-03-0031	270 µL	1	
ncKnight® NK 扩增因子 B	SN-03-0032	120 µL	1	

三、试剂材料

表 2: 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
ncKnight® NK 扩增因子试剂盒	首宁生物	SN-03-0030
ncKnight® NK 扩增基础培养基	首宁生物	SN-03-0020
NK-MAX 纯化因子	首宁生物	SN-03-0050
注射用重组人白介素-2	NA	NA
人血小板裂解液 (PLT)	NA	NA
T75 细胞培养瓶	NA	NA
T175 细胞培养瓶	NA	NA
淋巴细胞培养袋 (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

四、单个核细胞制备

4.1. 单个核细胞制备：本试剂盒推荐使用的单个核细胞来源一般为外周血和脐带血，形式上分为新鲜样本分离和冻存样本复苏，请根据实际情况参考对应操作步骤；

4.2. 外周血新鲜样本分离（不同淋巴细胞分离液根据相应说明书操作）

4.2.1. 自体血浆分离：将新鲜血液 $900 \times g$ 离心 20 分钟（升降速度调到最慢），离心后吸取上层淡黄色血浆于 50 mL 离心管（剩余血细胞层用于分离单个核细胞），置于 56°C 水浴 30 min 灭活，然后取出 $1200 \times g$ 离心 10 min 去除沉淀，灭活后的血浆转移至新的 50 mL 离心管，置于 4°C 冰箱保存备用。

4.2.2. 单个核细胞分离：将 4.2.1 中吸去血浆后剩余的血细胞层用生理盐水 1:1 稀释混匀，加至装有 Ficoll 的离心管中（避免破坏液体分界面）， $800 \times g$ 离心 25 min，吸取中间的白膜层，生理盐水或 DPBS 清洗两次并计数， $400 \times g$ 离心 10 min 后吸去上清液，沉淀的 PBMC 细胞可取适量准备直接激活培养（参考步骤五），也可根据需求进行冻存。

4.3. 提高扩增后 NK 细胞纯度：如实验需求，需要提高扩增后 NK 细胞的纯度，可在 PBMC 分离阶段在搭配 **NK-MAX 纯化因子**（首宁生物，SN-03-0050，625 μL ）使用，可使最终扩增的 NK 细胞纯度更高（CD3- CD56+ 表达率可高于 95%），且 CD3+ 细胞小于 1%

五、NK 细胞扩增（参考表 3）

5.1. NK 完全培养基配制：在生物安全柜中，按照下列比例配制 **NK 完全培养基**。

产品信息	货号	规格	配置方法
ncKnight® NK Medium Basal Medium	SN-03-0022	1000 mL	1000 mL Basal Medium 和 40 mL Supplement 混合成 NK 完全培养基 。
ncKnight® NK Medium Supplement	SN-03-0021	40 mL	
IL-2	NA	NA	按照 200 IU/mL 添加到完全培养基中。

5.2. 冻存单核细胞前处理：冻存的单核细胞需提前 24 小时复苏平衡，冻存细胞置于 37°C 水浴锅解冻后转移至生物安全柜内，将细胞悬液转移至无菌离心管中，逐滴缓慢加入 10 mL 复温的 **NK 完全培养基**，边加边摇匀，完全加入后轻柔混匀， $300 \times g$ 离心 5 分钟后去除上清，随后加入 **NK 完全培养基 + 5% 自体血浆**（自体血浆不足时可使用人血小板裂解物 PLT 替代）重悬细胞并接种， 37°C 培养箱过夜培养。

5.3. 激活培养基配置：取 10 mL **NK 完全培养基**（已添加 5% 自体血浆/PLT）至 50 mL 离心管中，加入解冻的试剂 A、B。用移液管吹打 2~3 次充分混匀。

表 3: NK 培养过程参考培养基体积*

时间	D0	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
体积 (mL)	10	10	15	20	35	70	150	300	450	600	1000	1600	2000	2000
操作	激活	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液	补液
容器	2×T25/T75				T175			细胞培养袋						

*本表仅供参考，由于样品个体差异，培养基体积会出现上下浮动的现象，需要对 NK 细胞生长状况进行观察计数分析后，按照最佳细胞生长密度进行补液操作。

- 5.4. (Day0) NK 细胞激活:** 取单个核细胞（新鲜分离的 PBMC 取 $1-2 \times 10^7$ 个活细胞，步骤 5.2 冻存复苏的 PBMC 复苏平衡 24 小时后，计数取 $1-2 \times 10^7$ 个活细胞）加 10 mL **激活培养基**，充分混合后将细胞悬液转移至 1 个 T75 中，随后置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养 3 天。
- 5.5. (Day3) 补液:** 取出 T75，补液 **NK 完全培养基** + 5% 自体血浆/PLT，将培养瓶置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中继续培养。
- 5.6. (Day4-Day7) 每天补液:** 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 完全培养基** + 5% 自体血浆/PLT。确保每天补液体积后细胞密度处于 $1.0-1.5 \times 10^6$ cells/mL 之间，后续补液按照同样方式计算补液体积，当补液后总体积大于 60 mL 时，转入 T175 细胞培养瓶中继续培养。
- 5.7. (Day8-Day13) 补液:** 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 完全培养基** + 1% 自体血浆/PLT。确保每天补液体积后细胞密度处于 $1.0-1.5 \times 10^6$ cells/mL 之间，后续补液按照同样方式计算补液体积，当补液后总体积大于 200 mL 时，转至细胞培养袋中继续培养（约 Day8/9）。转入培养袋后隔天补液。
- 5.8. (Day14-Day16) 收获细胞:** 一般情况下，14-16 天收获细胞最佳。
- 5.9.** 如需要进一步放大体系，可在本试剂盒之外，单独采购 ncKnight® NK 扩增基础培养基（首宁生物，货号 SN-03-0020，1040 mL），以适配更大体积的扩增需求。