

ncKnight® NK扩增因子试剂盒

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，可以实现人外周血来源NK细胞的高效扩增，NK细胞培养13-15天可扩增3000- 6000倍（以PBMC里含有10%的NK计算），NK细胞纯度较高（CD3-CD56+表达率可高于80%-95%）。

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	1Kit(2L)	1	
ncKnight® NK扩增因子试剂盒 NK 扩增基础培养基	SN-03-0020	1L /瓶	2	4℃储存 2-8℃运输
ncKnight® NK扩增因子试剂盒 NK 扩增因子 A	SN-03-0031	270 μL	1	-80 ~ -20℃储存 干冰运输
ncKnight® NK扩增因子试剂盒 NK 扩增因子 B	SN-03-0032	120 μL	1	

三、试剂材料

表 2：推荐配套试剂&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
注射用重组人白介素-2	金丝利	国药准字 S10970058
人血小板裂解液 (PLT)	NA	NA
DPBS	Gibco	C14190500BT
生理盐水	安徽双鹤药业	国药准字 H34023608
六孔板	Nunc	140675
T182 细胞培养瓶	广州洁特	TCF102600
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：单个核细胞来源一般为外周血，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

4.2.1 自体血浆分离：将新鲜血液 900×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 50mL 离心管（剩余血细胞层用于分离单个核细胞），置于 56℃水浴 30min 灭活，然后取出 1200×g 离心 10min 去除沉淀，将灭活后的血浆转移至新的 50mL 离心管，置于 4℃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×g 离心 25min，吸

取中间的白膜层，生理盐水或 DPBS 清洗两次并计数，400×g 离心 10min 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。（不同淋巴细胞分离液根据相应说明书操作）。

4.3 冻存外周血样本处理

DAY -1：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，复苏至少 3000 万 PBMC，冻存细胞置于 37℃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 20 mL 复温的 NK 扩增完全培养基，边加边摇匀，完全加入后轻柔混匀，300×g 离心 5 分钟后去除上清，随后加入 NK 扩增完全培养基重悬细胞（PBMC 密度维持在 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ）并接种至 T75 培养瓶，37℃培养箱过夜培养。

五、激活扩增培养

5.1 NK 扩增完全培养基配制： NK 扩增培养基+IL-2（200 IU/mL）。

5.2 激活培养基配置：取 10mL NK 扩增完全培养基培养基+5%自体血浆/PLT 至 50mL 离心管中，加入解冻的 NK 扩增因子 A、B。用移液管吹打 2~3 次充分混匀。

5.3 DAY0 -NK 细胞激活：取单个核细胞（新鲜分离的 PBMC 直接取 $5-10 \times 10^6$ 个活细胞，步骤 4.3 冻存复苏的 PBMC 复苏平衡 24 小时后，计数取 $5-10 \times 10^6$ 个活细胞）， 5×10^6 加 5mL 激活培养基， 10×10^6 个活细胞加 10mL 激活培养基，充分混合后将细胞悬液转移至 T25/T75 中；将培养瓶置于 37℃，5%CO₂ 培养箱中静置培养 3 天。

5.4 DAY3 -补液：翻倍补液 5×10^6 PBMC 起始补液 5mL NK 扩增完全培养基+5%自体血浆/PLT； 10×10^6 PBMC 起始补液 10mL NK 扩增完全培养基+5%自体血浆/PLT；置于

37°C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

5.5 DAY4-7 -每天补液: 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 扩增完全培养基+5%自体血浆/PLT**。确保每天补液体积后细胞密度处于 0.7×10^6 cells/mL - 1.5×10^6 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 50mL 时, 转入 T182/T175 细胞培养瓶中继续培养。

5.6 DAY8-12 -补液: 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 扩增培养基+2%自体血浆/PLT**。

确保每天补液体积后细胞密度处于 0.7×10^6 cells/mL - 1.5×10^6 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 200mL 时, 转至细胞培养袋中继续培养 (约 Day8/9) 。

5.7 DAY13-16 收获细胞: 一般情况下, 13-16 天收获细胞最佳。

表 3: NK 培养过程参考培养基体积*

时间	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D12	D13-D16
体积 (mL)	10	10	20	40	80	160	320	640	1000	1500	2000	2000
操作	激活	--	--	补液	补液	补液	补液	补液转袋	补液	补液	补液	补液
培养容器	T75			T182				淋巴细胞培养袋				

*本表仅供参考, 且以起始 10×10^6 个活细胞为例。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。