

NkVita 免疫细胞无血清培养基使用说明

一、产品简介

NkVita 免疫细胞无血清培养基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）的扩增培养，搭配首宁生物NK扩增试剂盒（RP03030）可实现人外周血和脐血来源 NK 细胞的高效扩增（NK 细胞培养 14-15天可扩增 5000-10000 倍，以PBMC里含有 10%的NK计算），NK细胞纯度高（CD3- CD56+表达率可高于 90%）。

二、产品信息

表 1： NkVita 免疫细胞无血清培养基-产品说明

产品信息	货号	规格	数量	储存条件
NkVita 免疫细胞无血清培养基-包含：	SN-03-0060	1Kit (1000mL)	1	
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Supplement-01	SN-03-0061	100uL/支	1	-20℃或-80℃
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Supplement-02	SN-03-0062	40mL/瓶	1	-20℃或-80℃
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Basal Medium	SN-03-0063	1L/瓶	1	2-8℃

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.)
NkVita 免疫细胞无血清培养基	首宁生物	SN-03-0060
NK 扩增试剂盒	首宁生物	RP03030
注射用重组人白介素-2	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:** 推荐使用的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（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×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，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。

4.3. 冻存样本处理（外周血和脐带血分离方法类似）

第-1 天（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 20mL 复温的 NkVita Basal Medium，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 NkVita 免疫细胞无血清培养基（按照 5.1 配制）重悬细胞并接种至培养瓶，密度控制在 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，37°C 培养箱过夜培养。

五、NK 细胞扩增（参考表 3）

- 5.1. **NK 扩增培养基**配制： NkVita Basal Medium (**1L**) + NkVita Supplement-02 (40mL) + IL2 (200IU/mL)。
- 5.2. 取 20mL **NK 扩增培养基** (5.1 配制) 至 50mL 离心管中，加入解冻的 NkVita Supplement-01 (**100uL*2**)，用移液管吹打 2~3 次充分混匀。
- 5.3. **(Day0) NK 细胞激活（第一轮激活）：**取单个核细胞（新鲜分离的 PBMC 取 **2×10^7** 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 **2×10^7** 个活细胞），取 1 支 NK 扩增试剂 A，复苏离心去上清后(参考步骤 4.3)，加入步骤 5.2 配制的培养基 20mL，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。
- 5.4. **(Day3) 补液：**取出 T75，补液 **NK 扩增培养基 10mL**，将培养瓶置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中继续培养。
- 5.5. **(Day4-Day7) 每天补液：**根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 扩增培养基**。确保每天补液体积后细胞密度处于 **$1.0 - 1.5 \times 10^6 \text{ Cells/mL}$** 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 35mL 时，转入 T175 细胞培养瓶中继续培养。

5.6. **(Day7) NK 细胞激活 (第二轮激活) ***: 复苏NK 扩增试剂 B (复苏参考 4.3 步骤, NK 扩增试剂 B 解冻转移至 50mL 无菌离心管中, 随后逐滴缓慢加入 27mL 复温的 NK 细胞无血清培养基, 其他步骤相同), 复苏后使用 **NK 扩增培养基**重悬 NK扩增试剂 B, 取样计数后加入培养瓶中, 并补液至 200mL。充分混合后将细胞悬液转移至合适的培养容器中, 随后置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养 3 天。

***Day7 进行第二轮激活仅供参考**, 由于样品个体差异, 细胞第一轮激活后扩增情况差异存在较大差异, 需要对NK 细胞生长状况进行观察计数分析, 总细胞数扩增 20 倍 (Day7-Day9) 后方可进行二轮激活。

5.7. **(Day8-Day13) 补液**: 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 **NK 扩增培养基**。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 200mL 时, 转至细胞培养袋中继续培养。转入培养袋后隔天补液。

5.8. **(Day14-Day15) 收获细胞**: 一般情况下, 14-15 天收获细胞最佳。

表 3: 培养过程参考培养基体积*

时间	D0-D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12-D14
总体积 (mL)	20	30	50	100	200	400	1000	2000	2500	3000	4000
操作	加A	补液	补液	补液 转瓶	补液	转袋 加B 补液	补液	补液	补液	补液	补液/ 计数收获
容器	T75			T175		淋巴细胞培养袋					

*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。