

NK 扩增试剂盒 使用说明书

一、产品简介

NK 扩增试剂盒用于人类自然杀伤细胞（NK）扩增培养的试剂盒，可以搭配主流的免疫细胞培养基使用，实现各类人 NK 细胞（外周血来源、脐血来源 NK 细胞等）的高效扩增（**11-13 天可扩增 6000-10000 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95%**）。

二、产品信息

表 1: NK 扩增试剂盒 产品说明

| 产品信息 | 货号 | 规格 | 储存条件 |
|--------------|-----------|-------|--------------|
| NK 扩增试剂盒-包含: | RP03030 | 1 Kit | 液氮储存 干冰运输 |
| NK 扩增试剂 A | RP03030-A | 1 mL | |
| NK 扩增试剂 B | RP03030-B | 4 mL | |

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.) |
|---------------------|---------------|------------|
| NK 扩增试剂盒 | 首宁生物 | RP03030 |
| 淋巴细胞无血清培养基 | CORNING | 88-581-CM |
| 注射用重组人白介素-2 | 双鹭药业 | 欣吉尔 |
| 人血小板裂解液 (PLT) | NA | NA |
| T75 培养瓶 | Thermo Fisher | 156499 |
| T175 培养瓶 | Thermo Fisher | 159910 |
| 淋巴细胞培养袋 (0.2-1.8 L) | 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和脐带血两种, 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;

注: (1) 为了避免抗凝剂占比过高影响自体血浆的使用, 应使脐血中的抗凝剂占比低于 30%。

(2) 采集血样时建议使用肝素钠抗凝的真空采血管, 勿用 EDTA 抗凝的真空采样管, 因为 EDTA 会影响 NK 细胞的激活与扩增。

4.2 **新鲜样本分离**(外周血和脐带血分离方法类似)

4.2.1 **自体血浆分离**: 将新鲜血液 $800 \times g$ 离心 25 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, 将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), $900 \times g$ 离心 30 min, 吸取中间的白膜层, 生理盐水清洗两次并计数, $400 \times g$ 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。
(不同淋巴细胞分离液根据相应说明书操作)。

五、NK 细胞扩增 (参考表 3)

5.1 **NK 细胞无血清培养基配制**: 淋巴细胞无血清培养基 + IL-2 (终浓度 200 IU/mL)。

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 细胞无血清培养基, 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 细胞无血清培养基 重悬细胞并接种, 37°C 培养箱过夜培养。

5.3 **NK 扩增试剂 A 复苏**: 复苏参考 5.2 步骤, 离心去除上清后, 加入 NK 细胞无血清培养基 + 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。 (NK 扩增试剂对渗透压比较敏感, 建议严格按复苏流程操作)

表 3：培养过程参考培养基体积*

| 时间 | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | D12- D14 |
|------------|---------|----|----|----|----|----------|-----|-----------|----------|-----|------|------|-------------|
| 体积 (mL) | 10 | 10 | 10 | 15 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1000 | 1200 | —— |
| 操作 | 加 A | —— | —— | 补液 | 补液 | 补液 转瓶 | 补液 | 加 B 补液 | 补液 转袋 | 补液 | 补液 | 补液 | 计数 收获 |
| 容器 | T75 培养瓶 | | | | | T175 培养瓶 | | | 淋巴培养袋 | | | | |

*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 第 0 天-NK 细胞激活：取活的单个核细胞（新鲜分离的 PBMC 直接取 5×10^6 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 5×10^6 个活细胞）+ 复苏后的 **NK 扩增试剂 A** + NK 细胞无血清培养基（补足至 10 mL）+ **5%自体血浆/PL (0.5 mL)**，在 T75 培养瓶中混合，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养 3 天。

5.5 第 3 天-补液：添加 NK 细胞无血清培养基（5 mL）+ 5%自体血浆/PLT（0.25 mL）；

5.6 第 4-6 天-每天补液：根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 NK 细胞无血清培养基 + 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（推荐细胞密度 1.0×10^6 cells/mL），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 50 mL 时，转入 T175 培养瓶** 中继续培养。

5.7 第 7 天- NK 细胞扩增：复苏 NK 扩增试剂 B（**复苏参考 5.2 步骤**，NK 扩增试剂 B 解冻转移至 50 mL 无菌离心管中，随后**逐滴缓慢**加入 **27 mL** 复温的 NK 细胞无血清培养基，其他步骤相同。），复苏后使用 NK 细胞无血清培养基（加 1% 自体血浆/PLT）重悬 NK 扩增试剂 B，取样计数后加入培养瓶中，并补液至 200 mL。

5.8 第 8-10 天-每天补液：补液并加入 1% 自体血浆/PLT。第 8/9 天**液体体积大于 200 mL 则转移至培养袋中（约 Day8/9）**。

5.9 第 11-14 天-补液/收获细胞：每天补液，一般情况下，11-14 天收获细胞最佳。

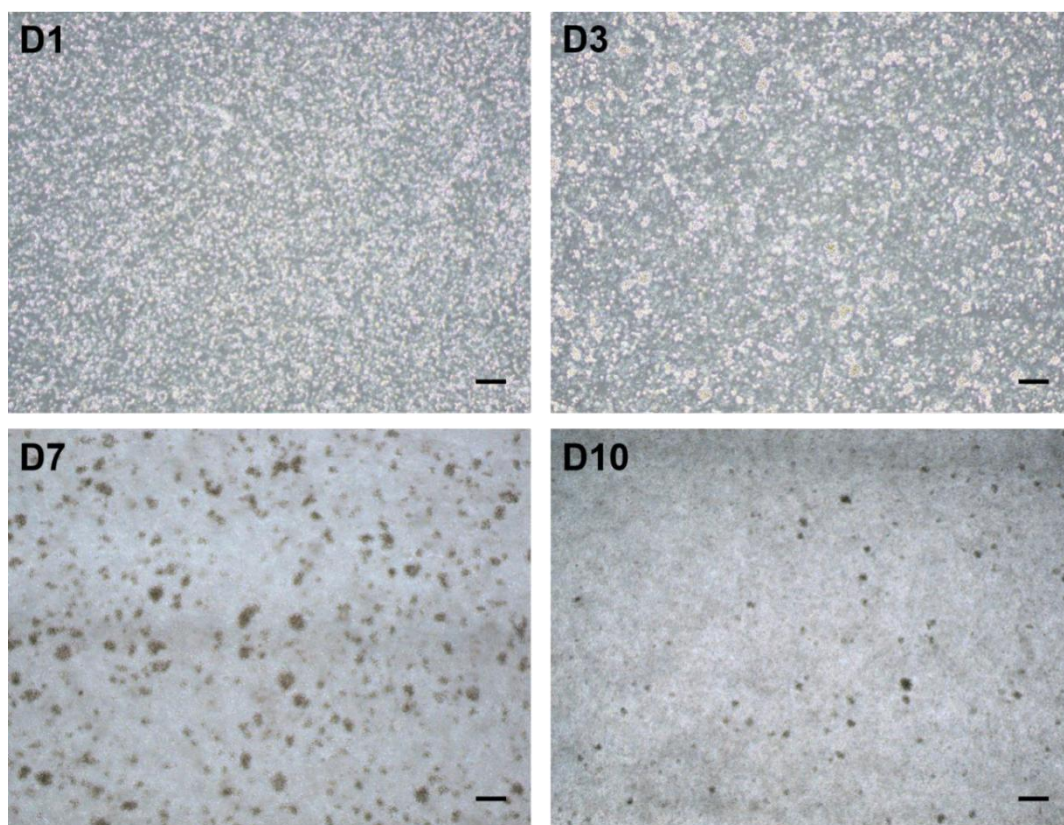


图 1: PBMC 来源 NK 细胞扩增 D1、D3、D7、D10 细胞形态图示, 标尺: 200 μm 。

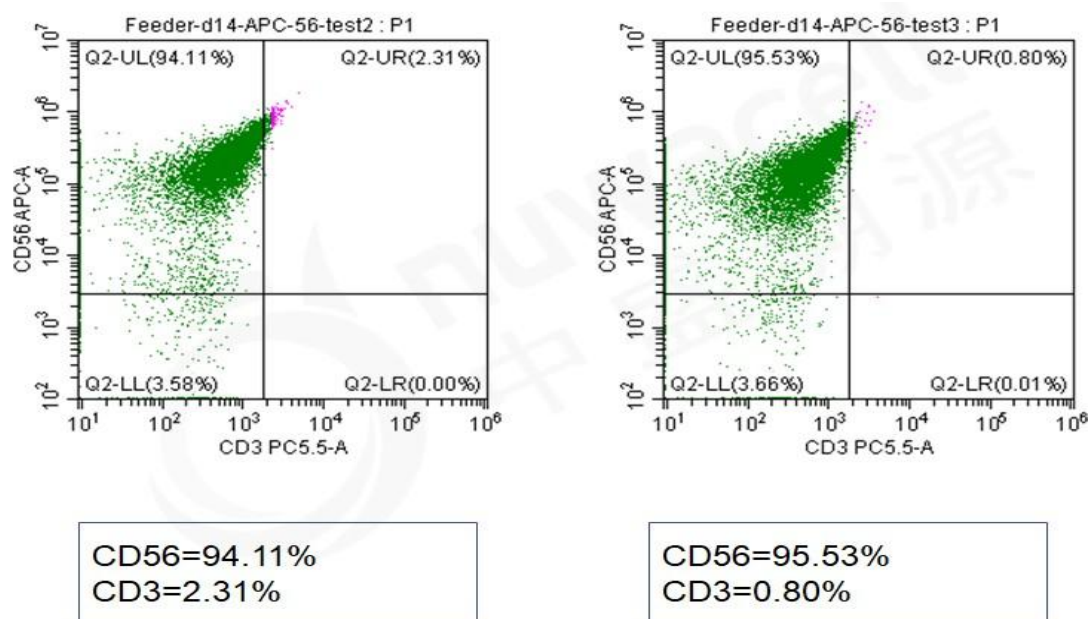


图 2: 培养 14 天后, PBNC 细胞的纯度检测, CD3- CD56+ 的细胞比例超过 90%。

六、培养过程中可能会出现的问题及解决方案

- **问题 1: D3 发现比较明显的聚团现象, 这个正常么, 是否要干预?**

回答: NK 细胞会特异性的结合NK 细胞扩增试剂并被激活, 宏观看就是细胞聚团生长, 这是正常现象, 标志着激活成功。正常在 Day7 左右, 这种聚团生长开始缓解, 细胞以小团开始生长, 整个过程中, 不建议吹打细胞, 每天补液即可。

- **问题 2: 细胞计数时用什么方法比较好?**

回答: 优先推荐血细胞计数仪、其次是 Vicell 细胞计数仪 (Beckman) 以及 Countstar; 各种计数仪器间存在一定的误差, 建议根据实际情况选择。