

## 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  $5 \times 10^6$  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  $5 \times 10^6$  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% CO<sub>2</sub> 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  $0.7 \times 10^6$  cells/mL -  $1.5 \times 10^6$  cells/mL 之间（推荐细胞密度  $1.0 \times 10^6$  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。

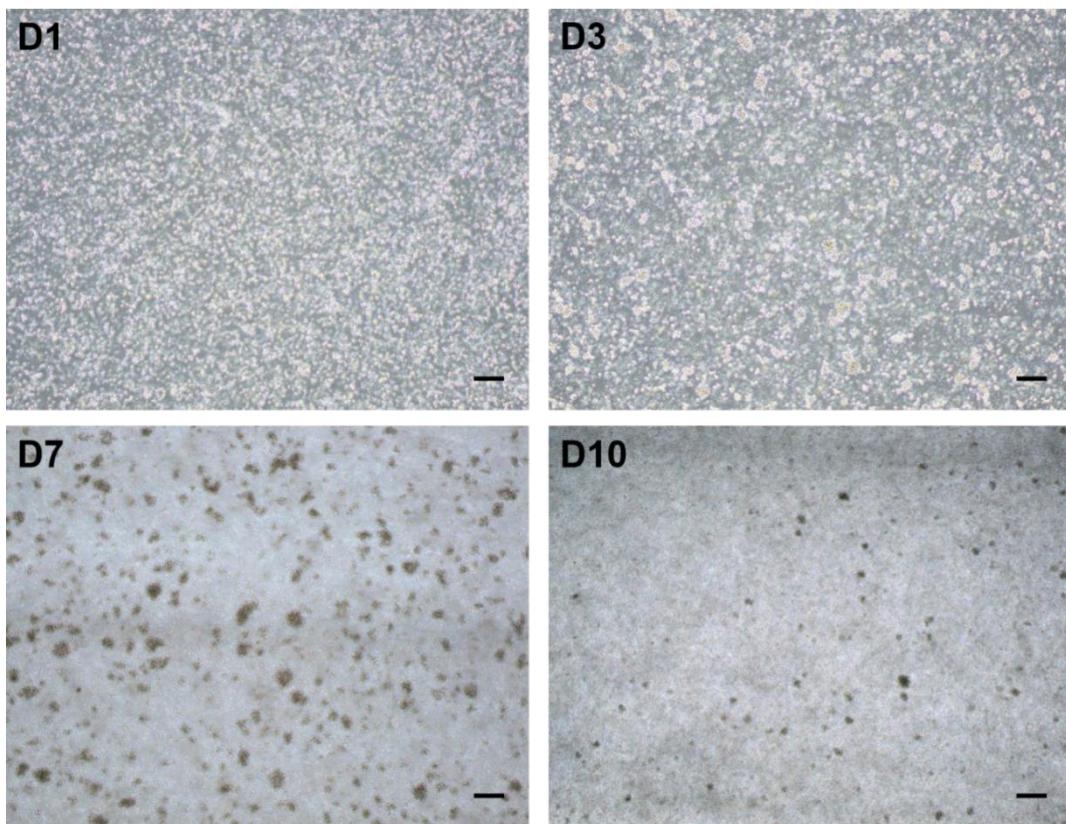


图 1: PBMC 来源 NK 细胞扩增 D1、D3、D7、D10 细胞形态图示，标尺: 200  $\mu\text{m}$ 。

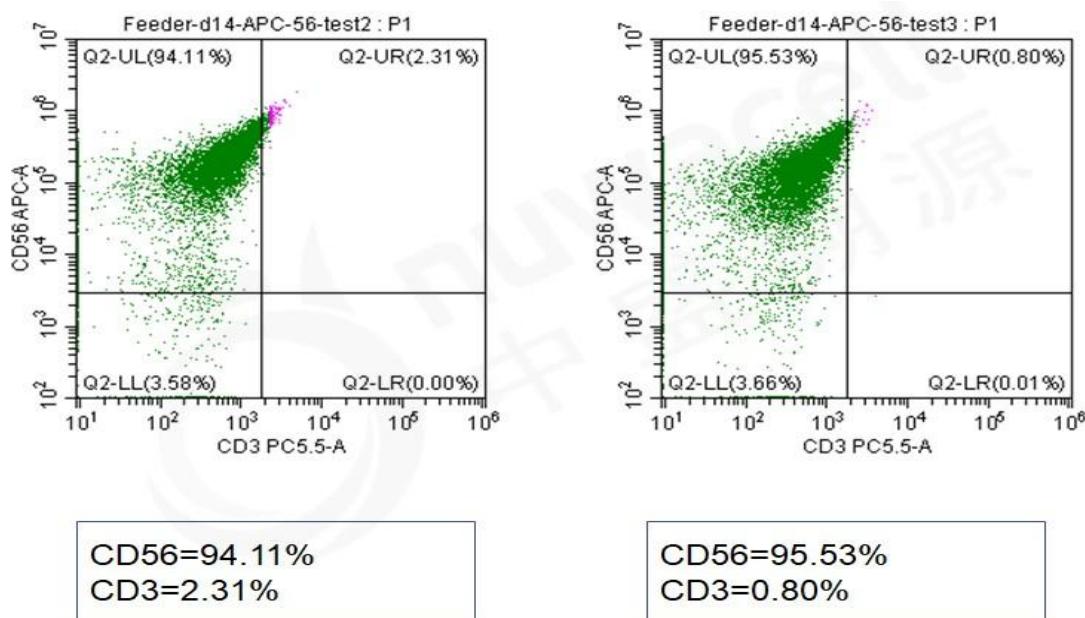


图 2: 培养 14 天后, PBNK 细胞的纯度检测, CD3- CD56+的细胞比例超过 90%。

## 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。