

NkVita 免疫细胞无血清培养基

操作使用说明

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（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	1 Kit (1000 mL)	1	
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Supplement-01	SN-03-0061	100 uL/支	1	-80°C 或 -20°C
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Supplement-02	SN-03-0062	40 mL/瓶	1	-80 °C
NkVita 免疫细胞无血清培养基 Basal Medium	SN-03-0063	1 L/瓶	1	2-8 °C

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 培养瓶	NA	NA
T175 培养瓶	NA	NA
淋巴培养袋 (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: 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 $900 \times g$ 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 (外周血和脐带血分离方法类似): 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 25min, 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. 冻存样本处理

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 20 mL 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 2×10^6 /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 (1 L) + NkVita Supplement-02 (40 mL) + IL2 (200 IU/mL)。

5.2. 取 20 mL NK 扩增培养基 (5.1 配制) 至 50 mL 离心管中, 加入解冻的 NkVita Supplement-01 (100 uL*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 10 mL, 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 $1.0-1.5 \times 10^6$ 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 35 mL 时, 转入 T175 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 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 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 200 mL。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 $1.0 - 1.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 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 200 mL 时, 转至培养袋中继续培养。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。