

## 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℃ 或 -20℃
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  $56^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $2 \times 10^6$  /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  $2 \times 10^7$  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  $2 \times 10^7$  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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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 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。