

NK 细胞培养试剂套装说明书

【产品名称】NK 细胞培养试剂套装

【产品货号】MCM-002+MCF-004

【包装规格】

1 盒 NK 细胞培养试剂盒：1 支试剂 A（0.5ml/支）、1 支试剂 B（0.5ml/支）、1 支试剂 C（0.5ml/支）、2 支试剂 D（1ml/支）。

2 瓶自然杀伤细胞无血清培养基：1L/瓶。

【预期用途】

本细胞培养试剂套装用于 NK 细胞培养，经 17 天培养，NK 细胞扩增倍数达 1000 倍（30-50ml 血液分离的细胞扩增总数可达 80-100 亿），CD3⁺CD56⁺NK 细胞比例≥60%，细胞活性>95%。

【储存条件及有效期】

NK 细胞培养试剂盒储存于-20℃（长时间储存请置于-80℃），自然杀伤细胞无血清培养基储存于 2-8℃。

有效期 12 个月。

【样本要求】

本试剂套装要求人新鲜外周血或新鲜脐带血分离获得的单个核细胞，且血常规检测中淋巴细胞数量在正常范围内，血液收集时应无菌操作且处理和运输过程中避免冷冻。**特别要求血液采集抗凝剂不能含有 EDTA 和枸橼酸钠，建议用肝素抗凝剂。**

【使用方法】

1. NK 细胞培养瓶包被

将 NK 细胞培养试剂盒中试剂 A、试剂 B 溶于 9ml DPBS 中，转移至一个 T175 培养瓶中，37℃避光放置 2-3h，或 4℃避光放置 12h 以上（推荐）。包被瓶有效期 3 天。

2. 淋巴细胞分离

2-1. 提前30min将淋巴细胞分离液从4℃冰箱中取出置于室温，待温度升至室温后使用。

2-2. 将抗凝血以700g离心20min（降速最慢），收集上层血浆，56℃灭活30min，然后4℃放置15min，最后2000g离心15min后吸取上层血浆4℃保存备用。

2-3. 除去血浆后的下层血液加入DPBS至原血液体积，混匀，沿管壁缓慢加至与血液等量的淋巴细胞分离液上，注意保持清楚的界面，以800g离心15min（缓升缓降），离心管中由上至下分为四层。第一层为DPBS层，第二层为环状乳白色淋巴细胞，第三层为分离液层，第四层为红细胞层。

2-4. 收集第二层环状乳白色淋巴细胞加入到一个50ml离心管中，补加DPBS至50ml，600g离心10min，弃上清液，再用50ml DPBS重悬细胞，此步骤取样进行细胞计数，500g离心10min，弃上清液。

3. NK 细胞完全培养基的配制

每瓶（1L）自然杀伤细胞无血清培养基中加入一支试剂 D、1ml（4 万 IU/ml）庆大霉素，配制成功 NK 细胞完全培养基。

4. NK细胞培养

4-1. 吸出包被的T175培养瓶中试剂，用10ml DPBS轻柔润洗包被瓶一遍，注意：添加DPBS时，请勿冲培养瓶底面。

4-2. 将上述得到的淋巴细胞用17.5ml NK细胞完全培养基重悬，将细胞转移到包被的T175培养瓶中，同时加入试剂C及2ml灭活血浆，置于恒温培养箱（37℃、5.0% CO₂、饱

和湿度)中培养。

4-3. 第4天, 补加36ml NK细胞完全培养基及4ml灭活血浆。

4-4. 第6天, 补加74ml NK细胞完全培养基及6ml灭活血浆。

4-5. 第8天, 将T175培养瓶中细胞完全吹打下来后, 瓶中加入剩余全部血浆, 将细胞转移至1个2L的细胞培养袋中, 补加NK细胞完全培养基至400ml/袋。

4-6. 第10天, 培养袋中补加NK细胞完全培养基至800ml/袋。

4-7. 第12天, 培养袋中补加NK细胞完全培养基至1400ml/袋。

4-8. 第14天, 培养袋中补加NK细胞完全培养基至2000ml/袋, 同时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

5. NK细胞收获

第17天, 2000rpm×10min离心条件收集NK细胞, 然后以2000rpm×8min离心条件用生理盐水洗涤细胞2次, 细胞计数, 用生理盐水重悬细胞制成终制品, 封装。

【产品性能指标】

1. 外观: 试剂盒标签、各组分标签清晰, 易识别, 各试剂小管置于产品内包装中, 各组分齐全, 液体无渗漏。培养基标签应清晰, 易识别, 液体应无渗漏。
2. 自然杀伤细胞无血清培养基 PH 值: 6.4~8.3。
3. 自然杀伤细胞无血清培养基渗透压 (mOsm/kgH₂O): 223~301。
4. 细菌内毒素: < 0.5EU/ml。
5. 细菌: 无细菌检出。
6. 真菌: 无真菌检出。
7. 支原体: 无支原体检出。
8. 细胞生长测试: 培养17天细胞扩增倍数达1000倍, 有效细胞 (CD3⁺CD56⁺表型NK细胞) 比例≥60%, 细胞活性>95%。

【注意事项】

1. 各试剂应置于规定储存条件保存, 避免微生物的污染。
2. 使用前, 试剂盒试剂从-20℃条件下取出, 置于4℃条件下缓慢解冻; 培养基从冰箱取出后, 需待溶液温度升至室温时, 摇匀后使用。
3. 使用前, 试剂盒试剂需瞬时离心。
4. 不同批次试剂盒中各组分不可互换使用。
5. 严禁使用过期产品。

【标识的解释】无

【参考文献】

- [1] R. Romee, J.W. Leong, T.A. Fehniger, Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer, Scientifica (Cairo), 2014 (2014) 205796.
- [2] T. Sutlu, E. Alici, Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects, JIntern Med, 266 (2009) 154-181.
- [3] M.J. Robertson, C. Cameron, S. Lazo, K.J. Cochran, S.D. Voss, J. Ritz, Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact dependent signals, Nat Immun, 15 (1996) 213-226.

【基础信息】

生产企业名称: 深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司

生产地址: 深圳市龙华新区龙华街道清祥路清湖工业园宝能科技园6栋A座15楼ABCDEF单位

联系方式: 0755-86548612

网址: <http://www.morecell.com.cn/>