

**NK 细胞高效扩增套装 ( 适用外周血体外诱导扩增 NK 细胞 )**

货号 : ZQ-TS006

**【产品组成】**

2L 培养体系套装：适用于 30-50mL 外周血的样本量，使用 2L 培养基

名称/型号	产品用途	产品规格	保存温度
NK 细胞培养基	NK 细胞扩增培养	1000mL/瓶 x2	2-8℃
NK KIT	NK-I: 包被 NK 培养瓶	1 支	-20℃
	NK-II: 配制完全培养基	2 支	
	NK-III: NK 培养时添加	2 支	
	NK-IV: NK 培养时添加	1 支	

**注意：**每次添加的培养基需提前取出放置培养箱中预温至 37℃，禁止将整瓶培养基放置 37℃ 反复预温。

**1. 样本预处理**

1.1 试剂准备

分离单个核细胞前，应将外周血、生理盐水和淋巴细胞分离液室温平衡至 20℃。

1.2 NK 细胞培养瓶包被：一个 T175cm<sup>2</sup> 瓶中加入 10mL DPBS 和 1 支 NK-I，充分混匀后平放，37℃ 孵育 2h。

1.3 血浆提取

1.3.1 将外周血分装到 50mL 离心管中，于室温离心 1200g，10min（快升慢降），取上层淡黄色血浆至新的 50mL 离心管中（下层红色血细胞层用于提取单个核细胞，56℃ 灭活 30min。）

1.3.2 血浆于 -20℃ 静置 15min 后，1200g，15min 离心，弃去沉淀，上清保存备用（一星期内使用置于 4℃ 保存，长期保存置于 -20℃）。

1.4 单个核细胞的分离

1.4.1 取 1.3.1 步骤离心得到的红色血细胞层，用生理盐水稀释到全血体积，混匀血细胞混悬液。

1.4.2 将与血细胞混悬液等体积的淋巴细胞分离液预装至 50mL 离心管中，再将血细胞混悬液平均加至淋巴细胞分离液上层（如 20mL 稀释血液，需要 20mL 淋巴细胞分离液，每管液体体积不超过 45mL），注入时使移液管口紧贴离心管壁，不要将血细胞混悬液混入到淋巴细

胞分离液中，室温离心 800g，18min（慢升慢降）。

1. 4. 3 离心后，液体分为三层，轻轻吸取中间单个核细胞层（白膜层）并转移至新的 50mL 离心管内；补生理盐水至 50mL，混匀。室温离心 600g，10min。弃上清，再次用 50mL 生理盐水重悬细胞，500g，10min 离心，弃上清。用 20mL 预温至 37°C 的完全培养基重悬细胞，同时取少量细胞悬液计数。

## 2. 配制 NK 完全培养基

NK 完全培养基配制：每瓶 NK 细胞培养基添加 1 支 NK-II 和 1 支 NK-III，充分混匀。（可按需添加抗生素）

## 3. 制备步骤

### 3. 1 第 1 天

3. 1. 1 取出 1. 2 中的 T175cm<sup>2</sup> 培养瓶(NK 细胞)弃去包被液，备用。

3. 1. 2 PBMC 接种:将 1. 4. 3 所得的细胞用 NK 完全培养基重悬，转移至 T175cm<sup>2</sup> 瓶中。瓶中添加 10%比例的自体血浆（总体积约为 25mL，调整细胞密度约 2\*10<sup>6</sup> 个/mL）。均置于恒温培养箱（37°C、5. 0% CO<sub>2</sub>、饱和湿度）中培养。

### 3. 2 第 2 天

NK 细胞培养瓶中添加 1 支 NK-IV。

### 3. 3 第 3 天

NK 细胞培养瓶中补加 30mL 完全培养基和 10%的自体血浆。

### 3. 4 第 5 天

NK 细胞培养瓶中补加 60mL 完全培养基和 10%的自体血浆。

### 3. 5 第 7 天

将 NK 细胞培养瓶中细胞完全吹打下来后，补加剩余血浆，转至一个 2L 容量的细胞培养袋中，补加 NK 细胞完全培养基至 600mL。

### 3. 6 第 9 天

补加 NK 细胞完全培养基至 1200mL/袋。

### 3. 7 第 11 天

补加剩余 NK 完全培养基至细胞培养袋中，取样自检无菌项目，并送第三方检测。

3. 7 第 13-15 天，收获细胞。

### 【特别说明】

#### ①分离 PBMC

分离 PBMC 应特别注意两点，一是分离 PBMC 前血液及各试剂应预温至 20℃，室温离心；二是血液采集后应在 8h 内分离 PBMC。

#### ②接种密度

推荐接种密度为 2E6/mL，接种密度过低或过高，对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。

#### ③转袋密度

推荐转袋后的密度 > 0.8E6/mL。

### 【注意事项】

- 1、注意无菌操作，避免污染；
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 3、仅供科研使用。