

NK 细胞培养试剂盒**说明书**

名 称	NK 细胞培养试剂盒
英 文	NK cell culture kit
货 号	ZQ-NK2L
规 格	2L 基础, 因子 1mL*4
保 存	2-8° C/-20°C避光保存 12 个月
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

NK 细胞培养试剂盒包括了激活、诱导和扩增需要的细胞因子和必要的培养基、培养添加物。本产品可刺激通过 Ficoll 分离获得并经过冻存的单个核细胞诱导分化为自然杀伤细胞(NK 细胞)。

【因子组成】

序号	试剂名称	数量
1	ZQNK-1	1 支
2	ZQNK-2	1 支
3	ZQNK-3	2 支
备注	请配合配套的 NK 细胞培养基使用	

【使用说明】**诱导用 NK 培养基的配制**

- (1) 使用前, 请将 ZQNK-2 置于室温环境解冻至因子完全溶解, 轻轻地上下颠倒试管以确保试剂混合均匀。
- (2) 用 70%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁, 室温放置数秒使酒精挥发。
- (3) 在洁净工作台中吸取 40mL 的 NK 培养基。
- (4) 无菌吸取 1ml ZQNK-2 加入 40mL 的 NK 培养基中, 尽可能的将所有试剂完全吸取。
- (5) 轻晃配制好的诱导用 NK 培养基, 确保混合均匀之后即可使用。

(6) 配制完成的培养基于 4° C 保存。

扩增用 NK 培养基的配制

- (1) 使用前, 请将 ZQNK-3 置于室温环境解冻至因子完全溶解, 轻轻地上下颠倒试剂管以确保试剂混合均匀。
- (2) 用 70%乙醇擦拭所有试剂管/瓶的开口外壁, 室温放置数秒使酒精挥发。
- (3) 无菌吸取 ZQNK-3 加入培养基中, 尽可能的将所有试剂完全吸取。
- (4) 每 900~1000mL 的 NK 培养基加入 1 支 ZQNK-3。
- (5) 轻晃配制好的扩增用 NK 培养基, 确保混合均匀之后即可使用。
- (6) 配制完成的培养基于 4° C 保存。

【操作规程】

实验材料: 复苏型 NK 细胞培养试剂盒; 细胞培养瓶(175cm²) ; 细胞培养袋; 一次性注射器 (60mL, 20mL) ; DPBS; 0.9%氯化钠注射液。

操作方法

1、培养瓶包被

- (1) 在 T-175 培养瓶中加入 13mL DPBS。轻轻摇晃, 使溶液在培养瓶瓶底扩散, 铺满瓶底。
- (2) 加入 1 支 ZQNK-1, 轻晃培养瓶, 使因子铺满培养瓶瓶底培养面。
- (3) 37° C 温度条件下静置 2~6 小时, 或者 4° C 温度条件下静置 24~72 小时。超过包被时间后不得使用。

2. 细胞接种(第 0 天)

- (1) 复苏后的单个核细胞经过洗涤后, 使用诱导用 NK 培养基重悬并定容至 20mL。
- (2) 从完成包被的培养瓶中吸出包被液。
- (3) 将重悬的细胞全部接种至培养瓶中, 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

3. 培养瓶加液(第 3 天)

- (1) 往培养瓶中加入 20mL 诱导用 NK 培养基。
- (2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

4. 培养瓶加液(第 5 天)

- (1) 往培养瓶中加入 40mL 扩增用 NK 培养基。

(2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

5. 培养瓶加液(第 7 天)

(1) 往培养瓶中加入 120mL 扩增用 NK 培养基。

(2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

6. 转入培养袋中补液(第 9 天)

(1) 对培养面贴壁的细胞进行轻柔吹洗, 吹洗过程中移液管不可刮蹭培养面。

(2) 收集所有细胞并转移至培养袋内。

(3) 往培养袋内加入 200mL 扩增用 NK 培养基。

(4) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱。

(5) 在培养袋 1/2 处折叠培养袋, 仅使用一半的培养袋体积进行细胞培养。

7. 培养袋补液(第 12 天)

(1) 往培养袋内加入 400mL 扩增用 NK 培养基。

(2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

(3) 完全展开培养袋平铺于培养箱中。

8. 培养袋补液(第 14 天)

(1) 往培养袋内加入 600mL 扩增用 NK 培养基。

(2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

9. 培养袋补液(第 17 天)

(1) 往培养袋内加入 600mL 扩增用 NK 培养基。

(2) 轻柔摇匀后放入 37° C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

10. 细胞收集(第 20 天)

(1) 将培养袋内细胞培养基全部收集至离心管内。

(2) 室温, 500g 离心 8min。

(3) 吸出上清液后用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。

(4) 室温, 500g 离心 8min。

(5) 吸出上清液, 用 0.9%氯化钠注射液将所有细胞重悬并收集到 2 个离心管中。

(6) 室温, 300g 离心 8min。

(7) 弃去上清, 按照预期用途使用适合的保存液重悬保存细胞。

【注意事项】

- 1、 注意无菌操作，避免污染；
- 2、 种瓶的单个核细胞冻存前推荐不少于 4×10^7 个，LYM/WBC 比例 $\geq 60\%$ ；
- 3、 在诱导培养期间请严格按照说明书进行操作，不要试图对细胞（特别是贴壁的细胞）进行吹吸操作，诱导培养期加液时轻柔操作；
- 4、 第 7 天及以后建议在操作前取样计数观测细胞生长状况，第 9 天转袋如细胞密度低于 1×10^6 /mL 时推荐延迟 1-2 天再进行转袋；后续补液前取样计数，如细胞密度低于 1.5×10^6 /mL 时推荐延迟 1-2 天 进行补液；
- 5、 试剂盒内的因子请在 -20°C 及以下温度保存，有效期为 1 年；
- 6、 试剂盒内请在有效期内使用；
- 7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 8、 仅供科研使用。