

NK 细胞高效扩增试剂盒（饲养层法）

Cat NO: IMC-019

产品描述

NK 细胞高效扩增试剂盒是一种专门设计用于体外扩增人类自然杀伤细胞 Natural Killer cells, NK cells) 的生物产品。该试剂盒能够与多种免疫细胞培养基兼容，以支持从不同来源（如外周血和脐带血）分离的 NK 细胞的高效增殖。在 11 至 13 天的培养周期内，NK 细胞的数量可以显著增加，扩增倍数可达 6000 至 10000 倍，假设原始的外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs）中含有 10% 的 NK 细胞。此外，该试剂盒还能保证扩增后的 NK 细胞具有高纯度，表现为 CD3-和 CD56+的表达率超过 90%。

适用范围

该试剂盒适用于新鲜外周血、新鲜脐血、冻存外周血、冻存脐血来源的单个核细胞。

规格

本试剂盒规格为 2L

运输和存储条件

液氮储存，干冰运输，保质期为参考下表。有效期为 6 个月，建议尽快使用。

配套产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMC-019-BM	NK 细胞基础培养基	1L*2	4℃，12 个月
IMC-019-A	NK 添加剂 A	1 mL	液氮，6 个月
IMC-019-B	NK 添加剂 B	4 mL	液氮，6 个月



所需试剂与材料

表 2. 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
Human IL-2	逸漠生物	IMF-I02
庆大霉素	润弘制药	—
T75 细胞培养瓶	Corning	430641
T175 培养瓶	Corning	431080
淋巴细胞培养袋	Takara	FU0002
Ficoll	Cytiva	17544202
NK 细胞高效扩增试剂盒	逸漠生物	IMC-019

实验步骤

1. 打开层流，打开生物安全柜的紫外线灯，废液缸和移液管同时照射。

2. 将外周血、生理盐水和淋巴细胞分离液室温平衡至 20℃。

3. **NK 细胞无血清培养液配制**: NK 细胞基础培养基 (2L) + 自体血浆 (后加) + IL-2 (200IU/mL) + 庆大霉素 (80U/mL)

单个核细胞的分离

1. 将外周血与生理盐水 1:1，吹打混匀。

2. Ficoll 使用前应上下颠倒混匀，按稀释后的血液与 Ficoll 的比例为 4:3，将稀释后的血液轻缓的加在 Ficoll 上面。

3. 400g，30min 离心（升 3 降 3），18-20℃。

4. 将上层的血浆吸取到离心管中，56℃，30 分钟灭活补体。之后，将血浆置于-20℃，静置 15 分钟，离心（800g，10min）以去除血小板，上清置于 4℃ 备用。

5. 轻轻吸取单个核细胞（白膜层）并转移至新的 50mL 离心管内；加入等体积生理盐水，室温 700g 离心 10min。弃上清，再次用 40mL 生理盐水清洗细胞，200g 离心 10min，弃上清，取少量细胞悬液计数。

NK 培养

1. 起始培养: 单个核细胞 + NK 细胞基础培养基 (30 mL) + 自体血浆 (1.5mL) + NK 添加剂 A (37℃



水浴复苏至完全溶解，复苏时间不宜过长，复苏后 PBS 清洗一次，350g，离心 3-5min，培养液重悬加入培养瓶），在 75cm² 培养瓶中混合，置于 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。

2. 第 3 天离心换液：350g，离心 5min，弃上清；细胞沉淀 + NK 细胞基础培养基（30 mL）+ 自体血浆（1.5mL），不换瓶。

3. 第 4-6 每天观察细胞，根据细胞悬液颜色或显微镜下细胞状态添加培养液，一般情况下，培养液颜色发生变化或细胞较多时添加，培养液添加量参考（NK 培养 7.）所述内容。每次加液时应按照加液量的 5%加入自体血浆。

4. 第 7 天计数，加液使 NK 细胞浓度在 $(0.8-1.0) \times 10^6$ Cell/mL，自体血浆按加液量的 1%添加。添加 NK 添加剂 B（37℃水浴复苏至完全溶解，复苏时间不宜过长，复苏后 PBS 清洗一次，350g，离心 3-5min，培养液重悬加入培养瓶）；当培养液体积大于 250mL 则转移至培养袋培养。

5. 第 8-11 天每天观察或计数，根据培养液颜色变化或细胞浓度添加培养液，自体血浆按加液量的 1%添加，建议通过细胞计数添加培养液。推荐细胞浓度 8-9 天应控制在 $(1.0-1.5) \times 10^6$ Cell/mL，第 10-11 天应控制在 $(1.5-2.0) \times 10^6$ Cell/mL。

6. 当细胞生长至所需数量时即可进行收集使用或冻存。一般情况下，12-13 天收集细胞最佳。

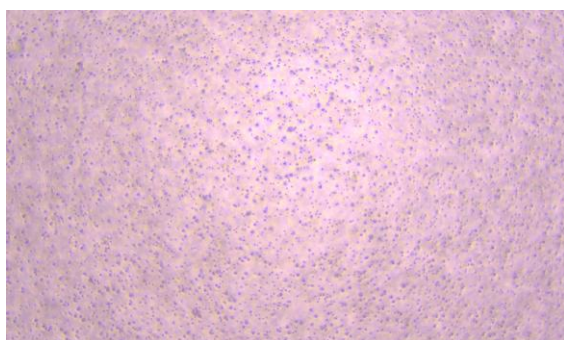
7. 无血清培养过程数据参考：

时间	Day0	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day8	Day9	Day10	Day11	Day12	Day13
处理过程	起始	不处理	不处理	换液	加液	加液	加液	加液+A2	加液	加液	加液	加液或不处理	收集或不处理	收集
细胞状态	/	/	/	/	培养液颜色明显变化或细胞较多			细胞浓度在 $0.8-1.0 \times 10^6$ Cell/mL	细胞浓度在 $1.0-1.5 \times 10^6$ Cell/mL		细胞浓度在 $1.5-2.0 \times 10^6$ Cell/mL		/	/
总体积 (mL)	30	/	/	30	50	100-120	200-250	400-500	800-900	1200-1400	1600-2000	2000	/	/

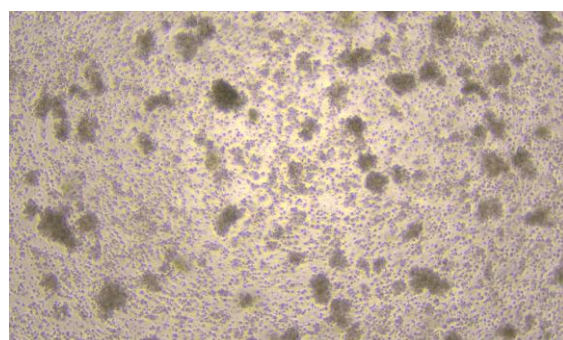


注意事项

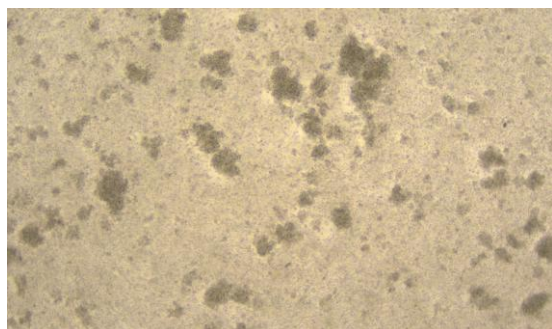
- (1) 血液采集建议使用肝素钠抗凝管或枸橼酸钠采血袋。
- (2) 自体血浆会影响细胞的培养状态，建议自体血浆预留量为 30mL 左右。溶血、高脂肪可能会影响 NK 细胞的扩增。
- (3) NK 添加剂 A、B 的使用，应严格按照常规细胞冷冻和复苏的要求进行操作。细胞复苏过程中严禁直接将冻存管全部浸没在水浴内，建议至少应保证管盖在水浴液面以上。
- (4) 细胞培养过程中，培养前 7 天出现细胞成团属于正常现象，操作过程请注意不要破坏细胞团。



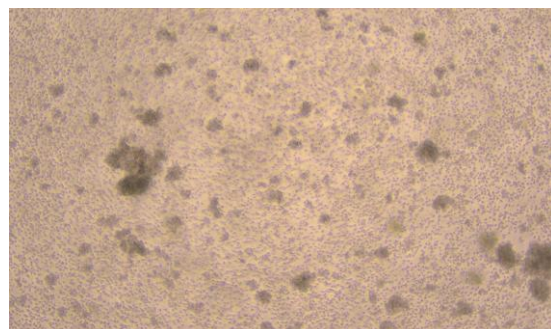
D0



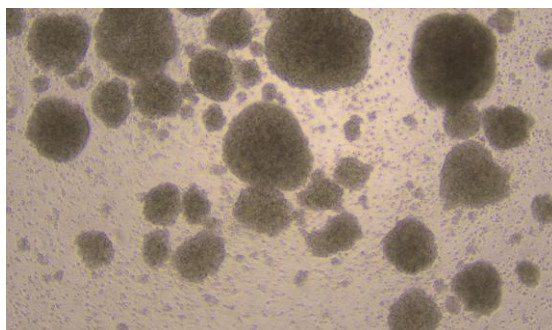
D3



D6



D8



D11

图 1: NK 细胞扩增 D0、D3、D6、D8、D11 细胞形态图示



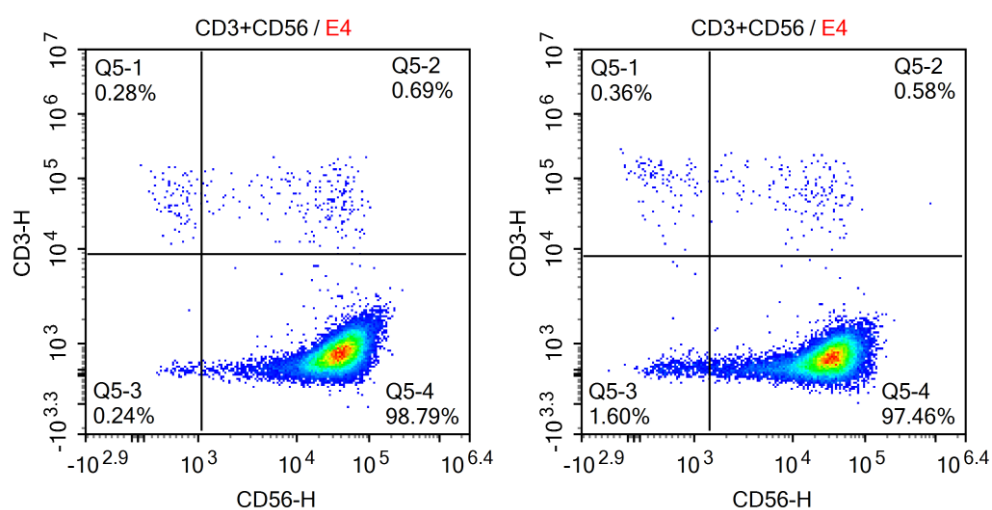


图 2: 培养后 NK 细胞的纯度检测

