

NK 细胞无血清扩增培养套装(2L 培养体系) 说明书

【产品名称】

中文名称：NK 细胞无血清扩增培养套装

英文名称：NK Cell Serum-free Expansion Kit

【产品概述】

细胞无血清扩增培养套装适用于自体外周血 PBMC 和脐血 CBMC，经体外活化扩增获得纯度较高的 NK 细胞。仅限体外研究使用。

【产品规格与保存】

产品名称	产品货号	规格	数量	储存条件	有效期
GenXion®-NK 细胞无血清扩增培养基	GNK2008	1L/瓶	2 瓶	2°C~8°C，避光保存	12 个月
GNK2008 - A 因子	GNK2008-2L	1ml/支	2 支	-20°C，避光保存	12 个月
GNK2008 - B 因子		250μl/支	1 支		
GNK2008 - C 因子		250μl /支	1 支		
GNK2008 - D 因子		250μl /支	1 支		
GNK2008 - E 因子		1ml/支	2 支		

【试剂准备】

配制完全培养基（1L）：添加 1 支 GNK2008-A 因子至 1L NK 细胞无血清扩增培养基中,混匀备用（另一瓶 1L NK 细胞无血清扩增培养基按需适时添加 1 支 GNK2008 - A 因子，备用）。

注：每次添加的完全培养基需提前取出放置室温复温 1h 以上，或取所需体积置于 25°C 恒温水浴槽中预热 30min 以上，禁止将整瓶培养基放入 37°C 孵箱复温。

【参考补液程序】

步骤	时间	试剂	容器	完全培养基	灭活血浆	总体积	备注
准备	D0	GNK2008-A 因子	/	1L	/	1L	先将 1 支 GNK2008-A 因子添加至 1L NK 细胞无血清培养基中，混匀备用（另 1 支 GNK2008-A 因子按需适时添加到另一瓶 1L NK 细胞无血清扩增培养基中备用）。
接种	D0	GNK2008-B 因子 GNK2008-C 因子 GNK2008-E 因子	T75 瓶	18ml	1ml	20ml	无需包被，直接混合刺激。
刺激	D3 （第 1 次补液）	GNK2008-D 因子 GNK2008-E 因子	T75 瓶	18ml	1ml	40ml	在培养瓶中补加 1 支 GNK2008-D 因子和 1 支 GNK2008-E 因子，混匀。
换瓶	D5 （第 2 次补液）	完全培养基	T175 瓶	40ml-60ml	2-3ml	80ml -100ml	使用移液枪轻轻吹吸瓶底，充分将细胞转移至 T175 瓶。
扩增	D7 （第 3 次补液）	完全培养基	培养袋/ T175 瓶	80ml-150ml	剩余血浆	160ml -250ml	细胞密度维持在 80 万-150 万个细胞/ml；根据细胞总体积分瓶或转培养袋培养。
	D9 （第 4 次补液）	完全培养基	培养袋	1: 1 补液	/	320ml -500ml	转细胞培养袋，细胞密度维持在 80 万-150 万个细胞/ml。
	D11/12 （第 5 次补液）	完全培养基	培养袋	1: 1 补液	/	640ml -1000ml	
	D13/14 （第 6 次补液）	完全培养基	培养袋	1: 1 补液	/	1280ml -2000ml	
收获	D15-18	完全培养基	培养袋	/	/	2000ml	收获细胞。

注：（1）培养基每次使用前需室温静置 1h 以上，或取所需体积置于 25℃ 恒温水浴槽中预热 30min 以上（禁用相关设备强制 37℃ 快速复温），后续操作均如此。

（2）灭活血浆以培养体系的 5%~10% 计算用量，如抗凝剂较多，建议血浆提高到 7%~12%。

（3）如无自体血浆，可以使用 FBS、AB 血清或血替，添加浓度与自体血浆保持一致。

【操作方法】

1、D0 接种-脐血 CBMC（或外周血 PBMC）分离与诱导（第 0 天）

（1）分离血浆：取少量血样（约 300 μ l）划线或滴入平皿进行检菌。室温下 400g-700g 离心 15 分钟，取离心上清作为血浆。

（2）血浆灭活：上层血浆 56℃ 灭活半小时，置于 4℃ 冰箱半小时，取出在室温下 800g-1000g 离心 10 分钟，取上清备用。

（3）分离 CBMC：等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀，加到 Ficoll 层上使分层保持清晰，室温下 400g 离心 25 分钟。

（4）洗涤细胞：吸取 CBMC 层，加生理盐水吹打混匀，室温下 300g-400g 离心 10 分钟，再次洗涤细胞。

（5）细胞计数：弃上清，用少量完全培养基重悬细胞，吸取少量细胞计数。调整细胞密度 200 万-300 万个细胞/ml。

（6）接种：将细胞悬液中加入 1 支 GNK2008-B 因子、1 支 GNK2008-C 因子和 1 支 GNK2008-E 因子，灭活血浆 1ml，转入 T75 培养瓶内，培养终体积约 20ml。

（7）剩余血浆 4℃ 密封保存备用。

2、D3（第 1 次补液，补加 GNK2008-D 因子和 GNK2008-E 因子）

（1）1:1 补液：加入 18ml 完全培养基+1ml 灭活血浆。

（2）在培养体系中添加 1 支 GNK2008-D 因子和 1 支 GNK2008-E 因子，培养终体积约为 40ml。

3、D5（第 2 次补液）

（1）转瓶：使用移液枪轻轻吹打培养瓶底部细胞，然后将所有细胞转移至新的 T175 瓶，注意收集细胞时尽量轻柔，不要破坏克隆团。

（2）1:1 补液：加入 40ml~60ml 完全培养基+2~3ml 灭活血浆，培养终体积约为 80ml~100ml。

4、D7（第 3 次补液）

（1）分瓶或转袋：使用移液枪轻轻吹打培养瓶底部细胞，然后将细胞分瓶到新的 T175 瓶培养；也可转入细胞培养袋中。

（2）按密度补液：取样计数，加入完全培养基+5%灭活血浆（不足 5%时，则加入所有剩余血浆），培养终体积约为 160ml~250ml，使细胞密度维持在 80 万-150 万个细胞/ml。

5、D9（第 4 次补液）

（1）转袋：将 T175 培养瓶中的细胞悬液转入细胞培养袋中；也可分瓶到新的 T175 瓶。

（2）1:1 补液：1:1 补液加入 160ml~250ml 完全培养基，也可按密度补液，补液后密度在 80 万-150 万个细胞/ml 范围内。

注：装袋前，轻微拍打培养瓶底部细胞，如克隆团太大可进行吹打，注意吹打的力度避免将克隆团吹成单个细胞；装袋后，需定期对培养袋进行拍打，使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

6、D11/12（第5次1:1补液）

1:1补液：1:1补液加入完全培养基，也可按密度补液，补液后密度在80万-150万个细胞/ml范围内。

注：装袋后，需定期对培养袋进行拍打，使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

7、D13/14（第6次1:1补液）

1:1补液：1:1补液加入完全培养基，也可按密度补液，补液后密度在80万-150万个细胞/ml范围内。

8、D15-D18（收获）

（1）检验：测密度，NK细胞纯度。

（2）收获：离心收获细胞，若因实验需要，可相应提前或延迟收获细胞悬液。

【注意事项】

1、血样要求：脐血/外周血 30ml-60ml，建议采血后4小时内进行分离CBMC/PBMC操作，也可使用冻存的CBMC/PBMC。

2、种瓶数量密度：CBMC/PBMC接种量约4000万/T75瓶~6000万/T75瓶；铺瓶的起始细胞密度建议200万-300万个细胞/ml。

3、补液密度：补液前密度一般在150万-300万个细胞/ml，补液后密度在80万-150万个细胞/ml，补液后密度不可低于60万个细胞/ml，补液时优先按照密度补液，在不方便计数的情况下再考虑1:1按照体积补液。

4、培养基的使用：

（1）每次补液前需要将培养基在室温下自然复温。

（2）禁止将整瓶培养基放入37℃孵箱复温，否则会加速补液培养基中细胞因子的失活。

（3）配制好的完全培养基时效较短，超过20天不建议使用，尤其是活化前期（前7天）。

5、正确处理和保存血浆：离心后的血浆要确保澄清，添加血浆时需考虑抗凝剂对血浆的稀释作用。

6、培养袋的使用：培养体积小于1L的时候，需要折叠培养袋再进行放置。

7、灵活掌握补液时机：细胞扩增状态不理想时，可推迟补液时间，扩增较快时可以提前补液，尤其注意第一次补液的时机。装袋后的补液体积可根据培养时间的情况进行调整。

8、控制细胞结团：细胞装袋前，需要根据克隆团的情况充分拍散细胞。装袋后也需每天对袋子进行拍打，揉搓肉眼观察较大的细胞团。

9、培养初期不要随意晃动培养瓶：否则活化的克隆团容易飘起来，而降低细胞因子对细胞团的活化。

10、固定实验耗材种类和型号：需提前评估变更型号、规格对培养效果的影响，如175的培养瓶，细胞培养袋等。

官方网址：<http://www.genesion.com.cn>

订货热线：4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

