

## NK 扩增试剂盒-使用说明

### 一、产品简介

NK 扩增试剂盒用于人类自然杀伤细胞 (NK) 扩增培养的试剂盒, 可以搭配主流的免疫细胞培养基使用, 实现各类人 NK 细胞 (外周血来源、脐血来源 NK 细胞等) 的高效扩增 (**NK 细胞培养 11-13 天可扩增 6000-10000 倍, 以 PBMC 里含有 10% 的 NK 计算**), NK 细胞纯度高 (**CD3- CD56+ 表达率可高于 90%**)。

### 二、产品信息

表 1: NK 扩增试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
NK 扩增试剂盒-包含:	RP03030	1 Kit	液氮储存 干冰运输
NK 扩增试剂 A	RP03030-A	1 mL	
NK 扩增试剂 B	RP03030-B	4 mL	

### 三、试剂材料

表 2: 推荐配套试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
NK 扩增试剂盒	首宁生物	RP03030
淋巴细胞无血清培养基	CORNING	88-581-CM
注射用重组人白介素-2	双鹭药业	欣吉尔
人血小板裂解液 (PLT)	NA	NA
T75 细胞培养瓶	Thermo Fisher	156499
T175 细胞培养瓶	Thermo Fisher	159910
淋巴细胞培养袋 (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

## 四、单个核细胞制备

4.1 **单个核细胞制备**: 单个核细胞来源一般为外周血和脐带血两种, 形式上分为新鲜样本分离和冻存样本复苏, 请根据实际情况参考对应操作步骤;

注: (1) 为了避免抗凝剂占比过高影响自体血浆的使用, 应使脐血中的抗凝剂占比低于 30%。

(2) 采集血样时建议使用肝素钠抗凝的真空采血管, 勿用 EDTA 抗凝的真空采样管, 因为 EDTA 会影响 NK 细胞的激活与扩增。

4.2 **新鲜样本分离(外周血和脐带血分离方法类似)**

4.2.1 **自体血浆分离**: 将新鲜血液 800×g 离心 25 分钟 (升降速度调到最慢), 离心后吸取上层淡黄色血浆于 50mL 离心管 (剩余血细胞层用于分离单个核细胞), 置于 56°C 水浴 30min 灭活, 然后取出 1200×g 离心 10min 去除沉淀, 将灭活后的血浆转移至新的 50mL 离心管, 置于 4°C 冰箱保存备用。

4.2.2 **单个核细胞分离**: 将 4.2.1 中吸去血浆后剩余的血细胞层用生理盐水 1:1 稀释混匀, 加至装有 Ficoll 的离心管中 (避免破坏液体分界面), 900×g 离心 30min, 吸取中间的白膜层, 生理盐水清洗两次并计数, 400×g 离心 10min 后吸去上清液, 沉淀的 PBMC 细胞可取适量准备直接激活培养 (参考步骤五), 也可根据需求进行冻存。(不同淋巴细胞分离液根据相应说明书操作)。

## 五、NK 细胞扩增 (参考表 3)

5.1 **NK 细胞无血清培养基配制**: 淋巴细胞无血清培养基+ IL-2 (终浓度 200IU/mL)。

5.2 **冻存单核细胞前处理**: 冻存的单核细胞需提前 24 小时复苏平衡, 冻存细胞置于 37°C 水浴锅解冻后转移至生物安全柜内, 将细胞悬液转移至无菌离心管中, 逐滴缓慢加入 10 mL 复温的 NK 细胞无血清培养基, 边加边摇匀, 完全加入后轻柔混匀, 300×g 离心 5 分钟后去除上清, 随后加入 NK 细胞无血清培养基重悬细胞并接种, 37°C 培养箱过夜培养。

- 5.3 **NK 扩增试剂 A 复苏:** 复苏参考 5.2 步骤, 离心去除上清后, 加入 NK 细胞无血清培养基 +5%自体血浆 (自体血浆不足时可使用人血小板裂解物 PLT 替代) 重悬细胞。 (NK 扩增试剂对渗透压比较敏感, 建议严格按复苏流程操作)

表 3: NK 培养过程参考培养基体积\*

时间	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12-D14
体积 (mL)	10	10	10	15	25	50	100	200	400	800	1000	1200	---
操作	加 A	---	---	补液	补液	补液 转瓶	补液	加 B 补液	补液 转袋	补液	补液	补液	计数 收获
容器	T75 培养瓶					T175 培养瓶			淋巴细胞培养袋				

\*本表仅供参考, 由于样品个体差异, 培养基体积会出现上下浮动的现象, 需要对 NK 细胞生长状况进行观察计数分析后, 按照最佳细胞生长密度进行补液操作。

- 5.4 **第 0 天-NK 细胞激活:** 取活的单个核细胞 (新鲜分离的 PBMC 直接取  $5 \times 10^6$  个活细胞, 步骤 5.2 冻存复苏的 PBMC 复苏平衡 24 小时后, 计数取  $5 \times 10^6$  个活细胞) + 复苏后的 NK 扩增试剂 A +NK 细胞无血清培养基 (补足至 10mL) + 5%自体血浆/PLT (0.5mL), 在 T75 细胞培养瓶中混合, 置于  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  培养箱中静置培养 3 天。

- 5.5 **第 3 天-补液:** 添加 NK 细胞无血清培养基 (5mL) + 5%自体血浆/PLT (0.25mL);

- 5.6 **第 4-6 天-每天补液:** 根据细胞悬液颜色或细胞密度添加 NK 细胞无血清培养基+5%自体血浆/PLT。确保每天补液体积后细胞密度处于  $0.7 \times 10^6$  Cells/mL -  $1.5 \times 10^6$  Cells/mL 之间 (推荐细胞密度  $1.0 \times 10^6$  Cells/mL), 后续补液按照同样方式计算补液体积, 当补液后总体积大于 50mL 时, 转入 T175 细胞培养瓶中继续培养。

- 5.7 **第 7 天- NK 细胞扩增:** 复苏 NK 扩增试剂 B (复苏参考 5.2 步骤, NK 扩增试剂 B 解冻转移至 50mL 无菌离心管中, 随后逐滴缓慢加入 27mL 复温的 NK 细胞无血清培养基, 其他步骤相同。), 复苏后使用 NK 细胞无血清培养基 (加 1%自体血浆/PLT) 重悬 NK 扩增试剂 B, 取样计数后加入培养瓶中, 并补液至 200 mL。

5.8 第 8-10 天-每天补液: 补液并加入 1%自体血浆/PLT。第 8/9 天 液体体积大于 200mL 则转移至细胞培养袋中 (约 Day8/9)。

5.9 第 11-14 天-补液/收获细胞: 每天补液, 一般情况下, 11-14 天收获细胞最佳。

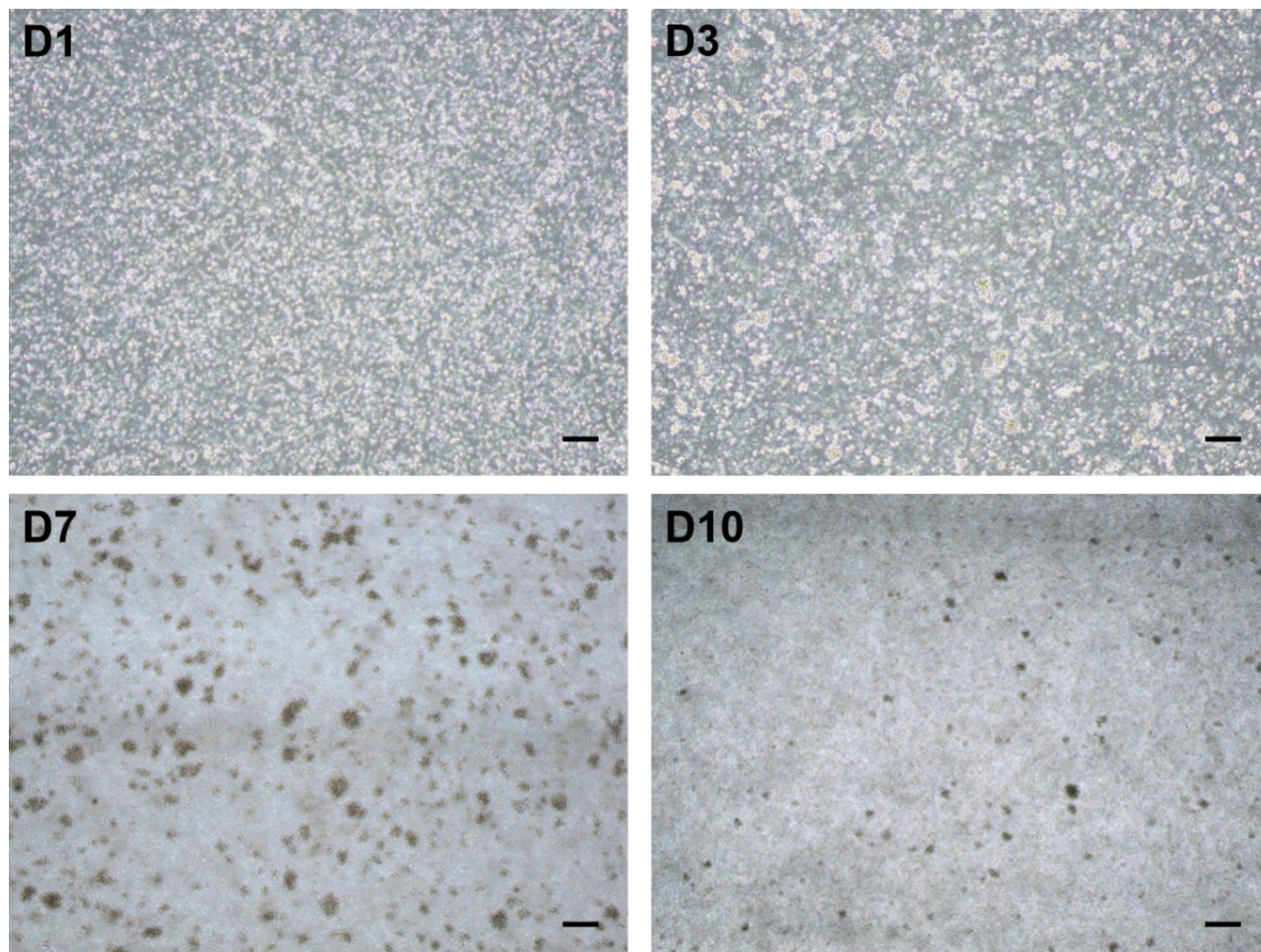


图 1: PBMC 来源 NK 细胞扩增 D1、D3、D7、D10 细胞形态图示, 标尺: 200 $\mu$ m。

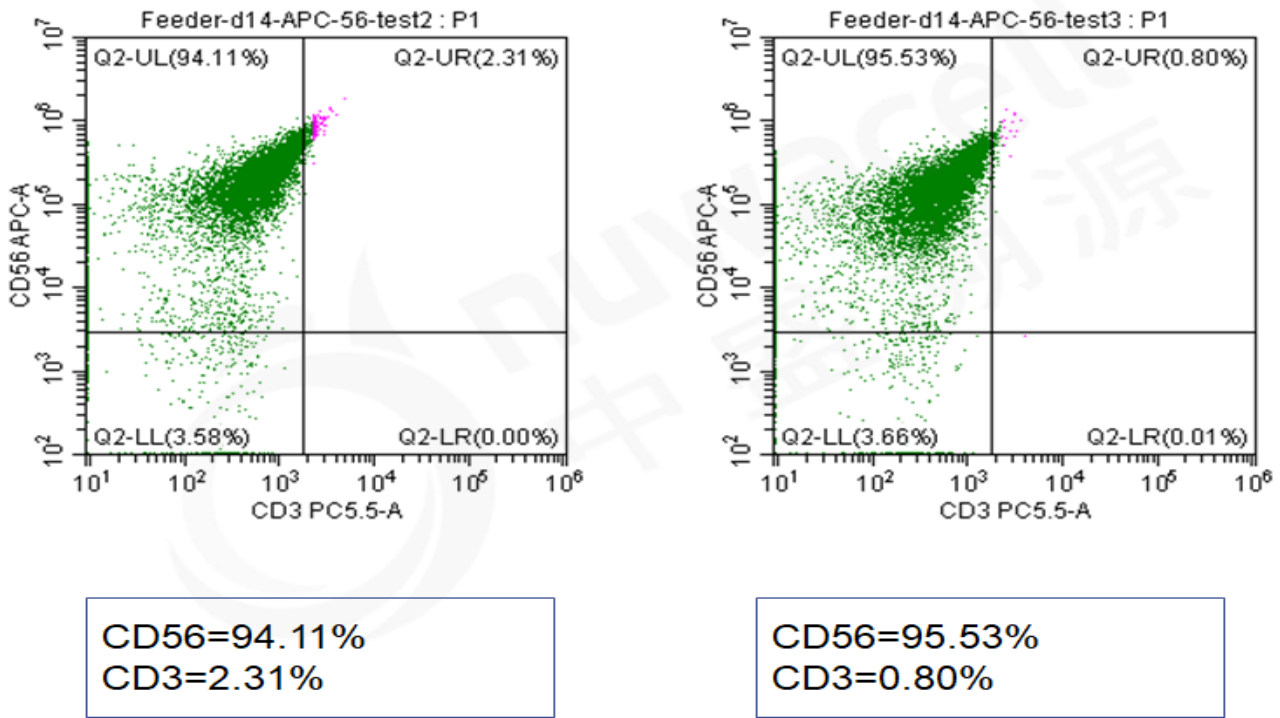


图 2: 培养 14 天后, PBNK 细胞的纯度检测, CD3- CD56+的细胞比例超过 90%。

## 六、NK 细胞培养过程中可能会出现的问题及解决方案

**问题 1: D3 发现比较明显的聚团现象, 这个正常么, 是否要干预?**

**回答:** NK 细胞会特异性的结合中盛溯源 NK 细胞扩增试剂并被激活, 宏观看就是细胞聚团生长, 这是正常现象, 标志着激活成功。正常在 Day7 左右, 这种聚团生长开始缓解, 细胞以小团开始生长, 整个过程中, 不建议吹打细胞, 每天补液即可。

**问题 2: 细胞计数时用什么方法比较好?**

**回答:** 优先推荐血细胞计数仪、其次是 Vicell 细胞计数仪 (Beckman) 以及 Countstar; 各种计数仪器间存在一定的误差, 建议根据实际情况选择。