



# 产品说明书

---

复苏型 NK 细胞培养试剂盒-4L 体系

货号：GD-B2

个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室

[WWW.NLAELPCT.COM](http://WWW.NLAELPCT.COM)



## 产品描述

由个体化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室精心开发的复苏型 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）。

本产品仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床、家庭以及其他用途。

## 试剂盒组成成分

序号	试剂名称	数量
1	CUNK-1	1 支
2	CUNK-2	1 支
3	CUNK-3	4 支
4	CUNK-4	4 支
备注	请配合配套的 NK 细胞培养基使用	

## 使用说明

- 所有工作必须在无菌环境中进行，请遵守严格无菌的工作规范，使用无菌耗材。

### 诱导用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 CUNK-2 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. 在洁净工作台中吸取 80mL 的 NK 培养基。
4. 无菌吸取 CUNK-2 加入 80mL 的 NK 培养基中，尽可能的将所有试剂完全吸取。
5. 轻晃配置好的诱导用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配置完成的培养基于 4° C 保存。

## 扩增用 NK 培养基的配制

1. 使用前，请将 CUNK-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 CUNK-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 CUNK-3。
5. 轻晃配置好的扩增用 NK 培养基，确保混合均匀之后即可使用。
6. 配置完成的培养基于 4° C 保存。

## 操作规程

### 实验材料

1. 复苏型 NK 细胞培养试剂盒；
2. 细胞培养瓶（175cm<sup>2</sup>）；
3. 细胞培养袋；
4. 一次性注射器（60mL、20mL）；
5. DPBS；
6. 0.9%氯化钠注射液。

### 操作方法

1. 培养瓶包被
  - a) 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。
  - b) 加入 1 支 CUNK-1，轻晃培养瓶，使因子铺满培养瓶瓶底培养面。
  - c) 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）
  - a) 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 40mL

- 后，加入 2 支 CUNK-4。
- b) 从完成包被的培养瓶中吸出包被液。
  - c) 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%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
3. 培养瓶加液（第 3 天）
- a) 往培养瓶中加入 40mL 诱导用 NK 培养基和 2 支 CUNK-4。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
4. 培养瓶加液（第 5 天）
- a) 往培养瓶中加入 120mL 扩增用 NK 培养基。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
5. 转入细胞培养袋（第 7 天）
- a) 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。
  - b) 收集所有细胞并平均转移至 2 个培养袋内。
  - c) 往每个培养袋内加入 100mL 扩增用 NK 培养基。
  - d) 轻柔摇匀，放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱。
  - e) 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。
6. 培养袋补液（第 9 天）
- a) 往每个培养袋内加入 200mL 扩增用 NK 培养基。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱。
  - c) 完全铺展培养袋进行细胞培养。
7. 培养袋补液（第 11 天）
- a) 往每个培养袋内加入 400mL 扩增用 NK 培养基。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
8. 培养袋补液（第 13 天）
- a) 往每个培养袋内加入 600mL 扩增用 NK 培养基。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
9. 培养袋补液（第 16 天）
- a) 往每个培养袋内加入 600mL 扩增用 NK 培养基。
  - b) 轻柔摇匀后放入 37° C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
10. 细胞收集（第 19 天）

- a) 将培养袋内细胞培养基全部收集至离心管内。
- b) 室温，500g 离心 8min。
- c) 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。
- d) 室温，500g 离心 8min。
- e) 小心吸出上清液，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。
- f) 室温，300g 离心 8min。
- g) 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. 种瓶的单个核细胞冻存前推荐不少于  $8 \times 10^7$  个，LYM/WBC 比例  $\geq 60\%$ 。
2. 在诱导培养期间请严格按照说明书进行操作，在转袋前的加液时轻柔操作，不要试图对细胞（特别是贴壁的细胞）进行吹吸操作。
3. 第 7 天及以后建议在操作前取样计数，如细胞密度低于  $1 \times 10^6/\text{mL}$  时推荐延迟 1-2 天进行转袋；如细胞密度低于  $1.5 \times 10^6/\text{mL}$  时推荐延迟 1-2 天进行补液。
4. 试剂盒内的因子请在  $-20^\circ \text{C}$  及以下温度保存，有效期为 1 年。
5. 试剂盒内请在有效期内使用。
6. 本说明书随着研究的进步会持续更新，最新的说明书请关注“个性化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室”公众号获取。