

ExCell Bio

NK 无血清培养基 NH02 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

User Manual

Catalog Number NH000-N022



I 产品概述

NK 无血清培养基 NH02 是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清 (Serum-Free)、无异源动物源成分的 NK 细胞维持和扩增培养基。包括 NK 无血清活化培养基、NK 无血清基础培养基、免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02、细胞因子 A、细胞因子 B、细胞因子 D 和细胞因子 E。和传统的含血清培养基相比, 无血清培养基的设计大大降低了在 NK 细胞培养过程中引入异源感染物的风险, 提高了培养基批次间的一致性, 并且避免了血清中的不明确成分可能导致的 NK 细胞过度激活以及细胞耗竭, 有利于进行临床及大规模转化。

I 产品规格及储存、运输要求

货号	品名	规格	保存条件	运输条件	数量	有效期
NH000-N022	NK 无血清培养基 NH02	2 L kit	/	/	1	12 个月
BA0261	NK 无血清活化培养基	100 mL	2-8 °C 遮光	< 25 °C 遮光	2	12 个月
BA0362	NK 无血清基础培养基	1000 mL	2-8 °C 遮光	< 25 °C 遮光	2	12 个月
BA0352	免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02	20 mL	2-8 °C 遮光	< 25 °C 遮光	2	12 个月
BA0351	免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02	4 mL	2-8 °C 遮光	< 25 °C 遮光	1	12 个月
BA0212	细胞因子 A	45 µL	-20 °C 遮光	< 0 °C 遮光	1	12 个月
BA0222	细胞因子 B	200 µL	-20 °C 遮光	< 0 °C 遮光	1	12 个月
BA0372	细胞因子 D	300 µL	-20 °C 遮光	< 0 °C 遮光	1	12 个月
BA0382	细胞因子 E	500 µL	-20 °C 遮光	< 0 °C 遮光	2	12 个月

NK 无血清活化培养基、NK 无血清基础培养基：

1. 产品存储过程中需要遮光，避免日光灯或其他灯光照射，在冰箱或仓库储存需要使用有色包装袋。
2. 运输说明：产品运输过程中需要遮光运输，避免日光灯或其他灯光照射对产品的外观产生影响导致外观变色。
3. 产品在使用过程中，需要进行转运至洁净区内时，转移过程需要进行清洁灭菌，灭菌方式只能采用消毒剂擦拭灭菌，不能使用紫外辐照灭菌。
4. 在经过带有紫外辐照灭菌的传递窗时，需要主动关闭传递窗内的紫外灯。

细胞因子 A、B、D、E：

1. 需存储于-20℃环境，产品存储过程中避免反复冻融，在产品有效期内可以保持产品性能稳定。
2. 运输说明：干冰运输，用户收货时需检查包装盒内是否有干冰，5支细胞因子处于是否处于冻存状态，检查正常后马上放于-20℃保存。如收货状态异常，请尽快联系销售方。
3. 使用前，将细胞因子取出，置于室温 10 min，完全融化后再开盖进行使用或分装，反复冻融不超过 3 次。

| 产品特点、应用与使用限制

1. 本品仅供科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗。
2. 实验结果可能因供体细胞的不同而可能会出现一定的差异。
3. 本产品不含有血清及异源体成分，不含有抗生素，如有需要可额外添加。
4. 产品需要在有效期内使用。

I 实验材料和试剂

1. NK 无血清培养基 NH02 (NH000-N022)
2. 外周血单个核细胞 (PBMC) 或脐带血单个核细胞
3. 热灭活自体血浆 (也可用商业化血清替代物或人 AB 血清代替) 使用
4. 培养板/培养瓶/培养袋
5. 淋巴细胞分离液、DPBS 溶液或生理盐水、离心管、移液管、移液枪和枪头;
6. 二氧化碳细胞培养箱、离心机、细胞计数仪、倒置显微镜、水浴锅等。

I 操作方法

【单个核细胞的分离】

1. 试剂准备：将血液采集至肝素钠采血管，分离单个核细胞前，将外周血、DPBS（生理盐水）和淋巴细胞分离液（推荐 GE 品牌，货号 17144002）平衡至室温。采血后建议尽快进行细胞分离，血液放置时间最好小于 8 小时。

2. 血浆提取

(1) 将外周血平均分装到 50 mL 离心管中，于室温下 700 g 离心 20 min（离心机升速 8，降速 4），取上层淡黄色血浆至新的 50 mL 离心管中（下层红色液体用于提取单个核细胞），于水浴锅中 56 °C 灭活 30 min。

(2) 1000 g 离心 15 min，取上清，置于 -20 °C，15 min，再次 1000 g 离心 10 min，取上清，置于 2-8 °C 保存（离心机升速 9，降速 9）。

【注意事项】

(1) 灭活离心后的血浆要确保澄清，浑浊的血浆会影响 NK 细胞的活化。

(2) 若使用 200 mL 采血袋采脐带血，添加血浆时需考虑抗凝剂对血浆的稀释作用，取血量 < 100 mL 时，建议将采血袋中抗凝剂抽出至少一半。

3. 单个核细胞的分离

(1) 外周血：下层红色血细胞沉淀用 DPBS 或生理盐水 1:1 稀释，混匀。

脐带血：下层红色血细胞沉淀用 DPBS 或生理盐水 1:2 稀释，混匀。

(2) 取 2 支新的 50 mL 的离心管，按照 1:1 的比例将稀释的血液缓慢加到淋巴细胞分离液上层，使血液和淋巴细胞分离液形成一个明显的分层，注意不要将稀释血液混入到淋巴细胞分离液中，室温 600 g 离心 30 min（离心机升速 3，降速 0）。

(3) 轻轻吸取单个核细胞（白膜层）并转移至新的 50 mL 离心管内，加入等体积 DPBS，室温 400 g 离心 10 min。弃上清，再次用 40 mL DPBS 清洗细胞，400 g 离心 10 min，弃上清。用预热至室温的完全培养基重悬细胞，取少量细胞悬液计数（离心机升速 9，降速 9）。

【注意事项】

(1) 提取脐血单个核细胞，建议使用红细胞裂解液裂解红细胞后进行计数。

培养基配制

1. 活化完全培养基配制：取 NK 无血清活化培养基和细胞因子 D，用 75% 酒精喷洒瓶身。在生物安全柜内打开 NK 无血清活化培养基、免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 和细胞因子 D 的盖子，每 100 mL NK 无血清活化培养基添加 2 mL 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 以及 150 μ L 细胞因子 D，盖好活化培养基的盖子，颠倒 3~5 次混匀，为 NK 细胞活化完全培养基（以下简称 NK 活化培养基）。

2. 扩增完全培养基配制：每一瓶 1000 mL NK 无血清基础培养基添加一支 20 mL 的免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 以及一支 500 μ L 细胞因子 E，为 NK 细胞扩增完全培养基（以下简称 NK 扩增培养基），配制后尽量在 1 周内使用完，也可将细胞因子 E 进行分装，根据比例减少完全培养基配制量，延长使用时间，细胞因子 E 冻融次数最多不超过 3 次。另外一瓶 1000 mL NK 无血清基础培养基可在待

使用时再添加一支 20mL 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 以及另外一支 500 μ L 细胞因子 E。

【注意事项】

- (1) 使用培养基前将添加组分和基础培养基分别置于室温，回复至室温后进行混合。添加组分在 2-8 $^{\circ}$ C 保存时可能有少量析出，为正常现象，不影响使用，放于室温或 37 $^{\circ}$ C 水浴后，析出成分会溶解。
- (2) 第 0 天接种和第 3/5 天补液使用 NK 活化培养基，第 7 天及以后使用 NK 扩增培养基。
- (3) 细胞因子放于室温约 10 min 至融化后、瞬离后再开盖使用。

使用步骤

1. 第 0 天

T75 培养瓶预处理：室温下融化细胞因子 A，取 50 mL 离心管，加入 15 mL DPBS，吸取 45 μ L 细胞因子 A 至 DPBS 中（若细胞因子 A 一次性用完，建议吸取 50 mL 离心管内 1 mL DPBS 将细胞因子 A 管冲洗 1 次并加回离心管内），上下颠倒混匀，加入底面积 75 cm^2 的细胞培养瓶（T75）中，前后左右晃动，使液体分散在瓶底，4 $^{\circ}$ C 包被过夜或 37 $^{\circ}$ C 紧急包被至少 2 小时。

PBMC 接种：取出活化过的 T75 培养瓶，弃掉包被液（不用 PBS 润洗培养瓶），在 T75 瓶中分别加入 NK 活化培养基、一支 200 μ L 细胞因子 B、10%比例的自体血浆（2 mL）和种子细胞，总体积为 20 mL。前后左右晃动，放入 37 $^{\circ}$ C，5% CO_2 培养箱中培养。

【注意事项】

- (1) 过夜包被的培养瓶在细胞接种前 10min 取出弃掉包被液，不可过早取出。
- (2) PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 $2-2.5 \times 10^6$ cells/mL，脐血初始 NK 比例较低时，可适当提高初始铺瓶细胞密度至 3×10^6 cells/mL。接种密度过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。
- (3) 接种细胞时，电动移液枪取细胞悬液打到非包被接触的瓶底，轻轻晃动瓶子铺匀，时间尽量短。

2. 第 3 天

沿培养瓶侧壁缓慢补加 18 mL 的 NK 活化培养基和 10%的热灭活自体血浆（2 mL），注意不要碰到

培养瓶底部，切勿吹打细胞，尽量减少计数、观察等操作，避免影响细胞初期生长。

3. 第5天

补加 160 mL NK 活化培养基和 5% 的热灭活自体血浆（8 mL），将 T75 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 培养瓶。

【注意事项】

(1) 建议分到 2 个 T175 中，每个 T175 瓶 100 mL 细胞悬液。

4. 第7天

补加 300 mL NK 扩增培养基和 1% 的热灭活自体血浆（3 mL），将 T175 瓶中的培养基和细胞转移至细胞培养袋。此时培养袋应对折，使用一半底面积。

5. 第9天

补加 500 mL NK 扩增培养基和 1% 的热灭活自体血浆至培养袋中，若血浆不足 1%，可以用 1% 血替替代，或者将剩余血浆全部添加进去，再补加 1% 血替，培养效果会更好。

6. 第11天

补加 600 mL NK 扩增培养基和 1% 的血替至培养袋中。

7. 第13天

将剩余的 600 mL NK 扩增培养基和 1% 的血替添加至培养袋中。

8. 第14-16天收获细胞。

9. 【参考补液程序】仅供参考，客户可根据细胞密度、培养基颜色变化进行调整。

步骤	时间	使用试剂	培养耗材	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
包被	-1 或 0 天	细胞因子 A D-PBS	T75	/	/		/
种瓶	0 天	细胞因子 B 活化完全培养基	T75	20 mL	20 mL	10%	2 mL
培养	3 天	活化完全培养基	T75	20 mL	40 mL	10%	2 mL
	5 天	活化完全培养基	T175	160 mL	200 mL	5%	8 mL
	7 天	扩增培养基	培养袋	300 mL	500 mL	1%	3 mL
	9 天	扩增培养基	培养袋	500 mL	1000 mL	1%血浆 或血替	剩余血 浆加 1% 血替 5mL
	11 天	扩增培养基	培养袋	600 mL	1600 mL	1%血替	6 mL
	13 天	扩增培养基	培养袋	600 mL	2200 mL	1%血替	6 mL
	14-16 天	收获细胞					

免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实

验者承担，本公司概不负责。