NK细胞无血清培养套装高性能版使用说明书——2L体系

【适用范围】
用于外周血或脐带血体外诱导扩增NK细胞

【产品组成】
2L培养体系套装：适用于 20-30mL外周血或脐带血的样本量，使用2L培养基

产品名称	产品用途	产品规格	保存条件	产品货号
NK细胞无血清培养基	NK细胞体外培养	1000mL/瓶x2	2-8℃ 12个月	NC0102
NK细胞 诱导因子试剂盒 （高性能版）	YC00A：起始培养时包被培养瓶使用	1支，500μL/支	-20℃ 12个月	AN0104
	YC00B：起始培养时添加	1支，500μL/支		
	YC00C：激活培养基添加	1支，200μL/支		
	YC005：扩增培养基添加	2支		
	庆大霉素：添加至培养基使用，100μL/1L	1支，300μL/支		

注意：
每次添加的培养基需提前取出放置培养箱中预温至37℃，禁止将整瓶培养基放置37℃反复预温。

【单个核细胞的分离】
1.试剂准备
分离单个核细胞前，应将外周血、PBS(生理盐水)和淋巴细胞分离液室温平衡至20℃。

2.血浆提取（离心机型号 Thermo ST-40R）
(1)将外周血平均分装到 50 mL 离心管中，于室温下 700g 离心 15 min(离心机升速 8，降速 4)，取上层淡黄色血浆至新的 50mL 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℃ 灭活 30min。
(2)900g 离心 10min，取上清，置于-20℃，15min，再次 900g 离心 10min，取上清，置于4℃ 保存。(900g 离心时离心机的升降速均调至最高即可)

3.单个核细胞的分离
(1)外周血：取上一步血浆提取后得到的下层红色液体用生理盐水1:1稀释，混匀，备用。
脐带血：取上一步血浆提取后得到的下层红色液体用生理盐水1:2稀释，混匀，备用。
(2)另取 2 支新的 50mL 的离心管，根据稀释血液的体积，按照 1:1 的比例将稀释血液缓慢加到淋巴细胞分离液上层。（如 20mL 稀释血液，需要 20mL 分离液） 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 700g 离心 30min。（离心机调节升速 6，降速 4）
(3)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 700 g 离心 10 min。弃上清，再次用 40mL 生理盐水清洗细胞，200g 离心 10 min，弃上清。用预温至37℃ 的激活培养基重悬细胞，备用，同时取少量细胞悬液计数。(离心机升速均调节至 9，降速 9)
注意：脐带血单个核细胞计数前应使用红细胞裂解液裂解红细胞。

【试剂准备】
1.激活培养基（200mL）：将融化的YC00C（200μL）加入200mL NK细胞无血清培养基中，混匀备用。
2.扩增培养基（1.8L）：每支 YC005 用1mL NK细胞无血清培养基溶解，以1：1000的比例添加至NK细胞无血清培养基中，混匀备用。
注意：提取PBMC、第0天接种和第3/5天补液必须使用激活培养基，不可使用扩增培养基。

【使用步骤】
1.第 0 天
T25 培养瓶包被:两个 T25 瓶中分别加入 5mL PBS 和 250μL YC00A，充分混匀后，37℃ 孵育 2h，弃去上清，并用 5mL PBS 清洗一次，注意不要冲刷培养瓶底部,弃清洗液后备用。
PBMC 接种：每个T25瓶中分别加入激活培养基、250μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆(1mL)和种子细胞, 总体积10mL，外周血单个核细胞细胞密度 1.5E6-2E6/mL，脐带血单个核细胞密度3E6/mL。
2.第 3 天
每个 T25 瓶中补加 19mL激活培养基和 5% 的自体血浆(1mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。
注意：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。
3.第 5 天
补加 140mL 激活培养基和 5% 的自体血浆(6mL)，将 2 个 T25 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 。
4.第 7 天
取样计数，密度在 1.5E6/mL 以上时，1:2 补液，补加 400mL 扩增培养基；密度在 1-1.5E6/mL 时，1:1 补液，补加 200mL 扩增培养基 ；添加 1% 血浆,若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。将培养基和细胞转移至细胞培养袋中。
5.第 9 天
1:1 补液，补加扩增培养基至细胞培养袋中。
6.第 11 天
1:1 补液，补加扩增培养基至细胞培养袋中。
7.第 13 天
将剩余的扩增培养基添加至细胞培养袋中。
8.第 14-16 天检测密度收获细胞

【参考补液程序】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	2*T25	激活培养基	20	20	10%	2
d3	2*T25	激活培养基	40	60	5%	2
d5	T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	培养袋	扩增培养基	200/400	400/600	1%	2/4
d9	培养袋	扩增培养基	400/600	800/1200	0%	0
d11	培养袋	扩增培养基	800	1600/2000	0%	0
d13	培养袋	扩增培养基	400	2000	0%	0

【特别说明】
1.分离单个核细胞
分离单个核细胞应特别注意两点，一是分离前血液及各试剂应预温至 20℃，室温离心；二是血液采集后应在8h内分离单个核细胞。
2.接种密度
外周血单个核细胞推荐接种密度为1.5E6-2E6/mL，脐带血单个核细胞推荐接种密度为3E6/mL，接种过低或过高对最终收获的细胞数和NK纯度都会有影响。
3.试剂保存
NK试剂盒因子禁止反复冻融，否则会降低其活性，导致阳性率较低。如暂时不用，请置于-20℃保存。已经融化的因子，如一周内使用，4℃保存即可。

【说明书核准日期】 2023年02月09日
【版本号】 4.1.5

生产企业：友康生物科技（北京）股份有限公司
地址：北京市海淀区丰贤中路7号A座三层、B座一层
ISO9001、ISO13485质量体系认证企业、国家高新技术企业
电话：010-58711655 网址：www.yocon.cn