

# 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

货 号

NH000-N022



## 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、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。

## 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	有效期
NH000-N022	NK 无血清培养基 NH02	2 L kit	-	-	-
BA0261	NK 无血清活化培养基	100 mL x2	2-8 °C 遮光	<25 °C 遮光	12 个月
BA0362	NK 无血清基础培养基	1000 mL x2	2-8 °C 遮光	<25 °C 遮光	12 个月
BA0352	免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02	20 mL x2	2-8 °C 遮光	<25 °C 遮光	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	12 个月
BA0212	细胞因子 A	45 µL	-20 °C 遮光	<0 °C 遮光	12 个月
BA0222	细胞因子 B	200 µL	-20 °C 遮光	<0 °C 遮光	12 个月

BA0372	细胞因子 D	300 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C 遮光	<0 $^{\circ}$ C 遮光	12 个月
BA0382	细胞因子 E	500 $\mu$ L x2	-20 $^{\circ}$ C 遮光	<0 $^{\circ}$ C 遮光	12 个月

## I 产品特点、应用与使用限制

### 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。
5. 可添加热灭活自体血浆、血清替代物（人血小板裂解物）或人 AB 血清使用，但是不可添加 ICSR 产品使用。

### 细胞因子 A、B、D、E：

1. 需存储于-20  $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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。

### 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 2mL 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 以及 150  $\mu$ 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 20mL 的免疫细胞无血清培养基添加组分 UE02 以及一支 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\text{cm}^2$  的细胞培养瓶（T75）中，前后左右晃动，使液体分散在瓶底，4 $^{\circ}\text{C}$  包被过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ 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 $^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  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  $2\text{--}2.5\times 10^6$  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  $3\times 10^6$  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。