

人NK细胞高效扩增试剂盒（PBMC起始）

【试剂材料清单】

试剂盒组成

产品货号：NXC-001

序号	名称	规格	保存温度
1	NK-因子 1	1 支	-20℃至-80℃ 避光保存
2	NK-因子 2	1 支	
3	NK-因子 3	1 支	
4	NK-因子 4	1 支	
5	NK-因子 5	1 支	
6	NK-因子 6	1 支	

配套试剂及耗材

序号	名称	货号	规格	保存温度
1	样本密度分离液（医用级）	NXC-001-1	100ml	RT
2	免疫细胞培养基（活化）	NXC-001-2	500ml * 1 瓶	2-8℃避光保存
3	免疫细胞培养基	NXC-001-3	1L * 2 瓶	2-8℃避光保存
4	PBS	NXC-001-4	500ml	RT
5	PBMC 高效离心管	NXC-001-5	50ml * 6 支	RT
6	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	NXC-001-6	1 个	RT
7	NK 免疫细胞添加物 (本试剂为非必须成分。不在常规组分内， 需单独采购) 在细胞培养期间内状态极度不佳时使用。		1 支	-20℃至-80℃ 避光保存

外周血 PBMC 细胞初始投入方案

由于不同个体外周血原始 NK 细胞数量占淋巴细胞数量比例差异性较大（健康成年人 NK 细胞占淋巴细胞比例约为 5%-15%之间）。推荐采集外周血量为 50-70ml（除去抗凝剂体积）。可获得 PBMC 约 6 千万-1.5 亿之间。

建议客户在实验开始前，将采集的外周血留出 1ml 进行流式检测，记录 NK 细胞比例（CD3- 56+ 16+）、细胞数量、细胞活率。并参照下表进行初始细胞投入。

情况	外周血 NK 细胞占淋巴细胞比例	细胞活率	投入 PBMC 总量（单位：个）	其中 NK 细胞数量（单位：个）
1	5%-10% (或无流式细胞仪)	90%-100%	9 千万及以上	405 万及以上
		85%-90%	1.5 亿及以上	637 万及以上
2	10%-15%	90%-100%	6 千万及以上	540 万及以上
		85%-90%	7.5 千万及以上	637 万及以上

个体差异影响 NK 细胞体外活化增殖的因素

1. **NK 细胞在外周血中的原始比例：**其占比越高增殖及活化效果越好；
2. **年龄：**健康人在 18-65 岁范围内，年龄越小培养效果越好。大于 65 岁人群其培养结果波动性较大。
3. **健康状况：**未用药、无急慢性病人人群其培养效果佳；
长期用药、放化疗或使用过免疫系统类药物的人群培养结果波动性较大。

第二部分 培养基的配制

▷ 活化培养基的配制

本套装包含一瓶 500ml 免疫细胞无血清培养基（活化）（产品货号：NXC-001-2），加入 NK-因子 5 摇匀即为 500ml 活化培养基。使用时现用现配，活化培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。

▷ 增殖培养基的配制

本套装包含两瓶 1000ml 免疫细胞无血清培养基，加入对应因子摇匀即为完全培养基。使用时现用现配，增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶，用完后再配制第二瓶。

1. 第一瓶：1000ml 免疫细胞无血清培养基（产品货号：NXC-001-3）中加入 NK-因子 1。
2. 第二瓶：1000ml 免疫细胞无血清培养基（产品货号：NXC-001-3）中加入 NK-因子 2。

第三部分 外周血采集

1. 使用一次性负压采血管抽取自体外周血 50-70ml。（首选肝素钠抗凝剂）
2. 请保证血液在安全无菌且温度为 20-30℃ 条件下平稳运送至实验室。
3. 新鲜血液 PBMC 最佳分离时间为取血后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

操作释义：

1. 肝素钠抗凝剂的必要性：由于血浆中的纤维蛋白原活化成为有活性的纤维蛋白，纤维蛋白交联成纤维蛋白血凝块，易使 PBMC 形成细胞团块，不利于细胞的活化。肝素钠抗凝剂可减轻上述情况发生几率。
2. 运输条件需保持常温状态（20℃-30℃），严禁冷藏冷冻运输及长期放置（4 小时以上），尽量平稳送至实验室，减少不必要的摇晃震动。低温、震荡或长期放置会导致红细胞破裂，血液理化性质发生改变，严重影响 PBMC 分离效果及细胞健康状态。

第四部分 NK 细胞的活化及培养流程 (2.5L 体系)

第 0 天:

1. 取出 2 支高效离心管，分别加入 16 ml 样本密度分离液，200g 离心 1min，确保离心后隔片下充满分离液，隔片上有 0.5-1cm 高度分离液。小心将 15-25ml 抗凝血缓慢沿管壁加至分离液界面上，确保血液与分离液之间有明显界面（每管可加 15-25ml 血液，若血量超过 25ml，则分管操作）。20-30℃ 环境下，离心力 600g，离心 30min（也可根据实际情况进行调节，注意离心机速度为慢升慢降）。
2. 离心后可观察从上至下分为 4 层，淡黄色血浆层，白色环状 PBMC 层，分离液层，红细胞层。用吸管吸取最上层淡黄色血浆（每 50-60ml 外周血约可获得 20-25ml 血浆），放置于无菌离心管中做灭活处理。

操作注意:

吸取血浆层时，吸管头请从上至下吸取，吸取至距离白色环状 PBMC 约 2mm 处时即可。如过分贴近 PBMC 层，可能造成 PBMC 的损失。

血浆的灭活步骤:

- ① 首先将含血浆的离心管置于水浴锅中 56℃ 静置 30min;
 - ② 接着放置于 -20℃ 环境下静置 10min;
 - ③ 最后 1200g，离心 15min;
 - ④ 保存离心后的上清至一支新的无菌离心管中，弃去底部沉淀;
 - ⑤ 取出第 0 天所需 5ml 血浆备用;
 - ⑥ 剩余血浆建议在第 3 天补液前进行 3 次 -80℃ ~ 37℃ 环境的反复冻融; 3 次冻融后 1200g，离心 15min; 弃去底部沉淀，于 4℃ 保存离心后的灭活血浆。（此步骤目的为尽量多的去除血浆中残留的纤维蛋白原，客户可根据自身需求选择性进行。）
3. PBMC 洗涤：用吸管吸取 PBMC 细胞层至 50ml 离心管中，为尽量获得更多细胞，建议

隔片以上部分全部吸取，注意不要吸到红细胞。在 PBMC 离心管中加入 PBS 混匀（PBS 与 PBMC 体积至少为 1:1，或加入的 PBS 体积大于 PBMC 体积），600g，离心 10min。弃去上清，加入 PBS 重悬洗涤，300g，离心 10min。

操作注意：

细胞每一次洗涤都会有相应损失，请客户酌情处理。离心有两种损失，第一种是机械损伤细胞，第二种是离心后上清液中有悬浮细胞。损失量约在 5%-15% 之间，建议第一次洗涤前进行细胞计数，如细胞数量过少，则酌情减少洗涤次数，但至少洗涤 1 次。

4. 分离出的 PBMC 用活化培养基 配制成细胞悬液 35ml，加入一整支“NK-因子 3”、一整支“NK-因子 4”、一整支“NK-因子 6”（三种因子总体积约为 5ml）。将上述所有液体加入到一个 T175 培养瓶中，加入 5ml 灭活血浆，置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂ 培养箱中培养，期间不要移动培养瓶。

操作注意：

1. 建议接种前计数，记录 PBMC 投入数量，以便后续实验步骤的分析调整；
2. 建议接种密度为 $1.5-3 \times 10^6$ 个/ml，如分离后细胞数少，则相对应减少培养基的量，但血浆及活化因子添加量不变；
3. 培养期间培养瓶盖需拧松至可透气且不掉落的 状态，约 0.5-1 圈（无论使用的是否为透气瓶，均拧松瓶盖。）
4. 建议使用纯度为 99.99% CO₂ 气体。

第3天:

加入 40ml 活化培养基, 加入 5ml 灭活血浆。

第5天:

加入 75ml 活化培养基, 加入 5ml 灭活血浆。

第6天:

加入 150ml 活化培养基, 加入 5ml 灭活血浆。(放入培养箱时, 将培养瓶口垫高, 至液体不会从瓶口溢出并拧松培养瓶盖)

第7天: (开始计数)

将培养瓶中贴壁的细胞充分吹打下来, 加入剩余灭活血浆, 转移到 1 个培养袋(产品货号: N2500TBD), 视细胞生长状态(计数), 建议培养袋补加 200ml 活化培养基。

请客户于培养的第7天及后续补液日仔细阅读以下操作释义:

一. NK 细胞培养中判断补液的标准是周期还是浓度:

NK 培养一般来说是按照浓度进行补液, 由于个体差异问题, 每个样本生长状况不可能 100% 相同, 按照天数来补液会有一些不准确, 所以按照浓度是相对稳妥的。添加培养基的时间不一定要严格按照后期时间进行, 根据具体情况具体分析, 确保细胞已经活化成功, 呈现聚团生长的情况, 细胞数量有增殖。在补加培养基后, 细胞密度至少维持在 1×10^6 个/ml, 有利于细胞的生长。

二. 关于培养密度及何时补液的问题:

1. NK 细胞培养的密度为 100 万个/ml~300 万个/ml。

2. 密度低于 100 万个/ml, 细胞间隔距离远, 细胞效应消失, 活化效率低, 增殖速度慢;

密度高于 250 万个/ml, 细胞间隔近, 生长空间小, 营养成分供应不足, 也会影响增殖速度。

最佳补液时机: 当细胞密度增殖到 150 万-200 万个/ml 之间, 根据公式: 当前细胞总量(单

位个) ÷ 100 万个 - 现有体积 (ml) = 本次需补加培养基体积 (ml), 将补液后的细

胞密度控制在 100 万个/ml。一般每隔 48 小时计数补液一次, 直到培养基完全用光。

3. 如计数后发现当前细胞密度达不到 100 万个/ml, 建议 48 小时后再计数, 细胞状态不好

或有凋亡现象, 立即补加 2-5ml 灭活人脐带血血浆。

三. 关于NK 细胞在培养过程中的结团问题:

1. 一般情况下, NK 细胞培养期间有结团现象是正常的, 由于血浆中有不可避免纤维蛋白存在, 容易造成细胞聚团或呈现絮状。经过反复吹打或摇晃可散开呈小团状为正常现象。

2. 使用的外周血不够新鲜, 有肉眼可见或不可见的凝血现象;

3. 密度过大 (超过 300 万个/ml) ;

4. 染菌, 细胞死亡, 纤维相互交缠;

5. 未及时补液, 细胞缺乏营养, 死细胞抱团。

四. 为什么我的 NK 细胞长的慢甚至不长?

1. 供血人的身体情况是否健康, 无急慢性病, 无不良生活习惯, 无特殊身体状况;

2. 血液新鲜度 (以外周血离体 4 小时为判断, 4 小时内为新鲜, 4 小时以上为不新鲜) ;

3. 试剂盒、培养液、分离液的保存温度各不相同，请放置在适宜环境下；
4. 细胞投入密度需达标，至少为 100 万个/ml，推荐为 150 万-300 万个/ml 之间；
5. 补液时机准确，培养液呈现橘色，且计数达标后进行补液，过早或过多补液都会造成细胞不增殖或者少增殖；
6. 接种前 3 天，不要移动培养瓶；
7. 培养环境要稳定，温湿度适宜，CO₂ 气体纯度 99.99%最佳，非必要不反复开关门。
8. 不论使用的是否为透气培养瓶，都要拧松瓶盖进行气体交换，只依靠透气膜的交换是远远不够的。

第 9 天:

视细胞生长状态（计数），建议补加增殖培养基 500ml。

第 11 天:

视细胞生长状态（计数），建议补加增殖培养基 500ml。

操作注意:

NK 细胞培养到 11 天开始呈指数增长。此时培养袋内可能会有片状、絮状或大团状细胞，一般为正常现象，经过补液和轻揉晃动，结团的细胞可自行散开。

第 13 天:

视细胞生长状态（计数），建议补加增殖培养基 500ml。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

第 15 天:

视细胞生长状态（计数），建议补加增殖培养基 500ml。做细胞流式检测。

第 16-17 天:

收集NK 细胞悬液 2500ml, 400g×10min 离心后弃去上清液, 250ml 离心管集 2 管每管生理盐水 200ml 洗涤(1500rpm×8min)1 次,再用 50ml 离心管生理盐水 100ml 洗涤(400g×10min) 1 次, 按照 200ml 生理盐水+ 8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞, 封装好后送至使用部门, 同时留样封存以备日后检测。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读本试剂盒说明书, 并严格按照说明书执行操作。
2. 本试剂盒必须按规定温度保存, 不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻, 并充分混匀, 不可剧烈震荡。
3. 可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。