

AMMS[®] NK 试剂盒套装 2.0 说明书

说明书编号: DS-Kit-AS22-A/0

产品名称

 通用名称: AMMS[®]NK 试剂盒套装 2.0

 英文名称: AMMS[®]NK Cell Culture Kit 2.0

产品信息

套装货号: AS-22

套装组成:

 AMMS[®] NK 细胞培养试剂盒 2.0 (货号: AS22-1)

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 试剂 A-2.0	AS22-1A	200 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 B-2.0	AS22-1B	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 C-2.0	AS22-1C	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月
NK 试剂 D-2.0	AS22-1D	500 μ L	1 支	-20 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

 AMMS[®] NK 无血清培养基 (货号: AS01-2)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
AMMS [®] NK 无血清培养基	AS01-2	1000mL	2 瓶	2~8 $^{\circ}$ C	液体	18 个月

产品描述

本产品适用于自体外周血或脐血 PBMC, 经体外活化扩增获得纯度较高的 NK 细胞。仅限体外研究使用。

使用说明

步骤	培养时间	使用试剂	培养容器	完全培养基	灭活血浆	总体积	备注
包被	-1 天	NK 试剂 A-2.0	175cm ² 培养瓶	/	/	/	包被瓶 4 $^{\circ}$ C 平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B-2.0	175cm ² 培养瓶	22.5mL	2.5mL	25mL	种瓶密度 2×10^6 个/mL
培养	3 天(第 1 次补液)	NK 试剂 C-2.0	175cm ² 培养瓶	46.5mL	3.5mL	75mL	请勿吹打细胞, 补加培养基不要碰到瓶底细胞层
	5 天(第 2 次补液)	NK 试剂 D-2.0	175cm ² 培养瓶	约 166.25mL	8.75mL	250mL	
装袋	7 天(第 3 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	约 350mL	剩余血浆	600mL	也可按密度补液, 补液后密度在 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 范围内, 补液后拍打培养袋使细胞均匀分布
分袋	9 天(第 4 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	每袋各加 300mL	/	1200mL	
	11/12 天(第 5 次补液)	完全培养基	细胞培养袋	每袋各加 400mL	/	2000mL	
收获	14 天、15 天	/	细胞培养袋	/	/	2000mL	收集细胞

注意事项: * 培养基每次使用前需室温静置 1h 以上 (禁用相关设备强制快速复温), 后续操作均如此。

* 灭活血浆以培养体系的 5%~10% 计算用量, 如抗凝剂较多, 建议血浆提高到 7%~12%。

AMMS[®]NK 试剂盒套装 2.0 参考操作方法:**包被 细胞活化瓶预处理 (-1 天)**

1 支 NK 试剂 A-2.0 和 13mL D-PBS 混匀, 加入 175cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 或 1 支 NK 试剂 A-2.0 和 9mL D-PBS 混匀, 加入 75cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 4 °C 冰箱平放过夜。次日种瓶前吸弃包被液。

种瓶 外周血 PBMC 分离与诱导 (第 0 天)

- 1、**分离血浆**。取少量血样 (约 300μL) 划线或滴入平皿进行检菌。室温下离心 15 分钟, 取离心上清作为血浆。
- 2、**血浆灭活**。上层血浆 56°C 灭活半小时, 置于 4°C 冰箱半小时, 取出在室温下离心 10 分钟, 取上清备用。
- 3、**分离 PBMC**。等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀, 加到 Ficoll 层上使分层保持清晰, 室温下离心 25 分钟。
- 4、**洗涤细胞**。吸取 PBMC 层, 加生理盐水吹打混匀, 室温下离心 5 分钟 (脐血建议 8 分钟)。再次洗涤细胞。
- 5、**细胞计数**。弃上清, 用少量完全培养基重悬细胞, 吸取少量细胞计数。调整细胞密度 2×10⁶ 个/mL。
- 6、**种瓶**。吸弃包被液, 将细胞悬液中加入 NK 试剂 B-2.0, 灭活血浆 2.5mL, 转入培养瓶内, 培养终体积约 25mL。剩余血浆 4°C 密封保存备用。

注意: * 完全培养基的配置: 每瓶培养基加入 1 支 IL-2, 终浓度为 1000IU/mL。

* 包被瓶从冰箱取出的时间约为细胞加入前的 10min。

培养 第一次补液 (第 3 天)

- 1、显微镜下观察细胞, 确定是否可以补液。①瓶底贴壁的克隆团达到瓶底面积的 30% 以上。②颜色与初始培养液比偏黄。(如无法判断, 可推迟一天补液。)
- 2、补液操作。加入 NK 试剂 C-2.0 和 3.5mL 灭活血浆, 再加入约 46.5mL 完全培养基, 培养终体积为 75mL。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

第二次补液 (第 5 天)

- 3、加入 NK 试剂 D-2.0, 和 8.75mL 灭活血浆, 再加入约 166.25mL 完全培养基, 培养终体积定容到 250mL。

注意: * 请勿吹打细胞!!!

* 第 5 天开始细胞增殖较明显, 中大团变多且分裂相形态细胞居多。

装袋 第三次补液 (第 7 天)

把剩余血浆加入培养瓶, 再将培养瓶中的细胞悬液转入细胞培养袋中, 随后补液 (约 350mL 完全培养基, 也可按密度补液, 补液后密度在 0.6~1×10⁶ 个/mL 范围内), 培养终体积定容到 600mL。

注意: * 装袋前, 轻微拍打培养瓶底部细胞, 如克隆团太大可进行吹打, 注意吹打的力度避免将克隆团吹成单个细胞。

* 装袋后, 需定期对培养袋进行拍打, 使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

分袋 第四次补液 (第 9 天)

①配置另一瓶 NK 完全培养基。②将培养袋中的细胞悬液分出一半加入新的培养袋, 随后每袋再补入 300mL 完全培养基。(培养终体积为 1200mL)

第五次补液 (第 11/12 天)

将剩余的约 800mL 完全培养基均分到 2 个培养袋中, 每袋终体积约 1000mL。

检验 细胞培养第 13 天, 用 5mL 注射器分别从袋内抽取少量细胞悬液进行细菌、内毒素、支原体检测。

收获 正常情况下, 第 14、15 天各收获 1000mL 细胞悬液。若因实验需要, 可相应提前或延迟。

AMMS[®]NK 试剂盒套装 2.0 使用注意事项

1、血样要求：

①外周血 PBMC $>3\times 10^7$ cells（推荐采血量 50mL 左右，用肝素钠真空采血管），建议采血后 4 小时内操作，建议做淋巴细胞亚群分析。不建议使用冻存的外周血。

②脐带血（不含抗凝剂）推荐采血量 >50 mL，建议把采血袋中抗凝剂抽出至少一半（大约 14mL），其他容器建议抗凝剂不超过 14%（或 PBMC $>3\times 10^7$ cells），采血后 12 小时内操作。

*注：不含抗凝剂的 50mL 脐带血所能提取的单个核细胞量一般为 $5\sim 8\times 10^7$ 左右。以此作为参考。

2、**种瓶密度：**PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 2×10^6 个/mL，脐血可适当提高初始铺瓶细胞密度。

3、**补液密度：**补液前密度一般在 $1.5\sim 2\times 10^6$ 个/mL；补液后密度一般在 $0.6\sim 1\times 10^6$ 个/mL，不可低于 0.6×10^6 个/mL。

4、培养基的使用：

① 每次补液前需要将培养基在室温下自然复温。

② 禁止将整瓶培养基放入 37°C 孵箱复温，否则会加速补液培养基中细胞因子的失活。

③ 配置好的扩增培养基（含 IL-2）时效较短，超过一周不建议使用，尤其是活化前期（前 7 天）。

5、**正确处理和保存血浆：**具体见说明书。离心后的血浆要确保澄清，添加血浆时需考虑抗凝剂对血浆的稀释作用。

6、**培养袋的使用：**培养体积小于 1L 的时候，需要折叠培养袋再进行放置。建议使用我司推荐型号。

7、**灵活掌握补液时机：**细胞扩增状态不理想时，可推迟补液时间，但是尽量不要调整补液的体积尤其注意第一次补液的时机。装袋后的补液体积可根据培养时间的情况进行调整。

8、**控制细胞结团：**细胞装袋前，需要根据克隆团的情况充分拍散细胞。装袋后也需每天对袋子进行拍打，揉搓肉眼观察较大的细胞团。

9、**包被时间：**A 因子包被后需 4°C 平放过夜。（紧急情况下可尝试 37°C 包被 2 小时）

10、**培养初期不要随意晃动培养瓶：**否则活化的克隆团容易飘起来，而降低包被因子对细胞团的活化。

11、**设备保养：**定期检查 CO_2 培养箱温度、浓度并及时更换滤网。定期保养和清洁生物安全柜。

12、**环境监测：**定期更换初效、中效、高效过滤器，保证洁净区环境标准。

13、**固定实验耗材种类和型号：**需提前评估变更型号、规格对培养效果的影响，如 175 的培养瓶，细胞培养袋等。