

AMMS[®] NK 试剂盒套装 2.0 (PLUS) 说明书

说明书编号: DS-Kit-R-AS29-A/0

产品名称

 通用名称: AMMS[®]NK 试剂盒套装 2.0 (PLUS)

 英文名称: AMMS[®]NK Cell Culture Kit 2.0 (PLUS)

产品信息

套装货号: AS-29

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 扩增添加剂 E (货号: AS29-1E)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
AMMS [®] NK 扩增添加剂 E	AS29-1E	5mL	2 瓶	2~8 $^{\circ}$ C, 避光保存	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, 避光保存	液体	18 个月

产品描述

本产品适用于新鲜或冻存外周血 PBMC(肝素钠抗凝管采集),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	175 cm ² 培养瓶	/	/	/	包被瓶 4 $^{\circ}$ C平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B-2.0	175 cm ² 培养瓶	22.5 mL	2.5 mL	25 mL	种瓶密度 1.5-2.0 \times 10 ⁶ /mL

培养	3 天	NK 试剂 C-2.0	175 cm ² 培养瓶	46.5 mL	3.5 mL	75 mL	前 5 天需静置培养, 操作时要平拿平放, 勿剧烈晃动细胞。补液时不要碰到瓶底细胞层, 勿吹打细胞。培养至第 7 天, 若观察到培养基颜色变化快(可计数), 则进行补液, 否则延长培养一天再进行补液。补液后密度不低于 $0.6 \times 10^6/\text{mL}$ 。请勿在培养瓶中培养过长时间。
	5 天	NK 试剂 D-2.0	175 cm ² 培养瓶	约 166.25 mL	8.75 mL	250 mL	
	7/8 天	完全培养基	细胞培养袋	350 mL	剩余血浆	600 mL	
	9/10 天	完全培养基	细胞培养袋	600 mL	/	1200 mL	
	11/12 天	完全培养基	细胞培养袋	800 mL	/	2000 mL	
收获	14 天	无血清培养基(含 IL-2)	细胞培养袋	收集细胞或补充 2000 mL	/	4000 mL	收集细胞或继续培养
	16/17 天	/	细胞培养袋	/	/	4000 mL	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 (PLUS) 参考操作方法:

包被 细胞活化瓶预处理(第-1 天)

1 支 NK 试剂 A-2.0 和 13 mL D-PBS 混匀, 加入 175 cm² 培养瓶(非 TC 处理)中, 平放晃匀铺满, 或 1 支 NK 试剂 A-2.0 和 9 mL D-PBS 混匀, 加入 75 cm² 培养瓶中, 平放晃匀铺满, 4℃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。将采血管中血样移至 50 mL 离心管中, 取少量血样(约 300 μL)划线或滴入平皿进行检菌。50 mL 离心管中血样室温下离心 1800 rpm (757g), 15 min, 升 9 降 7, 取离心后的上清作为血浆。

2. 血浆灭活。取上层血浆至 50 mL 离心管, 置于 56℃水浴锅灭活半小时, 后置于 4℃冰箱半小时, 取出在室温下离心 3000 rpm (2100g), 10 min, 离心后取上清备用。

3. 分离 PBMC。取第一步离心后的血细胞沉淀与等体积的生理盐水混匀, 混匀后缓慢加到 Ficoll 层上使分层保持清晰, 稀释后的红细胞沉淀与 Ficoll 体积比 1:2(通常 15 mL 的 Ficoll 上加入 30-35 mL 的血细胞沉淀), 室温下离心 2000 rpm (935g), 25 min, 升 9 降 0。

4. 洗涤细胞。离心后吸取 PBMC 层(白膜层), 加生理盐水吹打混匀, 室温下离心 1800 rpm (757g), 8 min。再次洗涤细胞(共洗涤 2-3 遍)。

5.细胞计数。将细胞重悬于 10 mL 完全培养基进行计数。取 $3.75\sim 5\times 10^7$ 细胞，补充完全培养基将细胞密度调整为 $1.5\sim 2.0\times 10^6/\text{mL}$ ，含 10% 灭活血浆（2.5 mL），一支 NK 试剂 B-2.0（0.5 mL），终体积约为 25 mL。剩余血浆可 4°C 保存备用。

*备注：若初始细胞少，终体积小于 12.5 mL 时，可采用 T75 培养瓶进行培养。

6.种瓶。铺瓶前 10-15 min，取出包被瓶，吸弃包被液。将细胞悬液加入已包被好的培养瓶中，放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养。

注意：* 完全培养基的配制：每瓶培养基加入 1 支 IL-2（终浓度为 1000 IU/mL），1 支 NK 扩增添加剂 E。

* 包被瓶从冰箱取出的时间约为细胞加入前的 10 min。

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瓶底克隆团达到瓶底面积的 30%以上。②颜色与初始培养液相比偏黄（橙色）。否则降低补液体积（培养基颜色偏黄，但克隆较少），或延长培养 1 天再进行补液（培养基颜色偏红，克隆较少）。

2. 补液操作。根据以上判断标准补液，加入 NK 试剂 C-2.0 和 3.5 mL 灭活血浆，再加入 46.5 mL 完全培养基，培养终体积为 75 mL。培养瓶取放、镜下观察及补液操作时请勿剧烈晃动细胞，尽量平拿平放。

注意：* 请勿吹打细胞！！

第二次补液（第 5 天）

加入 NK 试剂 D-2.0，和 8.75 mL 灭活血浆，再加入约 166.25 mL 完全培养基，培养总体积 250 mL。

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。

第 7 或 8 天（转袋）

观察细胞状态和培养基颜色。可观察到有大量细胞聚集生成，培养基颜色由红色转为橙色时可进行补液和转袋。此时可取样计数或流式分析，若细胞密度低于 $1.0\times 10^6/\text{mL}$ 时，继续培养 1 天再进行补液。补充约 350 mL 完全培养基，加入剩余自体血浆。培养总体积约 600 mL，可分为两袋培养。

注意：装袋前，如果有少量克隆贴壁，可先将细胞全部转入袋中，吸取少量新鲜完全培养基吹打培养瓶底部，然后将所有细胞转入袋中。补液后细胞密度不低于 $0.6\times 10^6/\text{mL}$ 。请勿在培养瓶中培养过长时间。

第 9 或 10 天

若细胞生长迅速，颜色变化较快，可补充培养基 600 mL，总体积约为 1200 mL。

第 11 或 12 天

若细胞生长迅速，颜色变化较快，可补充培养基 800 mL，总体积约为 2000 mL。

第 13 天

用 2 mL 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。

第 14 天 收集细胞或补液

收集细胞：将细胞培养液转移入离心管中，离心去掉上清。

需要延长培养时，可直接补充无血清培养基 1000~2000 mL，含 rhIL-2（1000 IU/mL），**请勿再补充扩增添加剂 E。**

注意：延长培养时，请不要再继续补充添加剂 E，否则会促进 NK 细胞过度成熟。

第 16 天 收集细胞

收集细胞：同前。

注意事项**1.血样要求：**

①外周血 PBMC $\geq 3.75 \times 10^7$ 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。

2.种瓶密度： PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 $1.5-2 \times 10^6$ 个/mL。

3.补液密度： 补液前密度一般在 2×10^6 个/mL 以上；补液后密度不可低于 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 配置好的完全培养基（含 rhIL-2）时效较短，建议一周左右使用完，尤其是活化前期（前 7 天）。

5.培养初期不要剧烈晃动培养瓶，不要吹打细胞： 否则活化的克隆团容易飘起来，从而降低包被因子对细胞团的活化。

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.延长培养： 延长培养时，请不要再继续补充添加剂 E，否则会促进 NK 细胞过度成熟。

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.因子的使用: 为减少因子挂壁的损失, 建议使用前进行离心处理, 将含因子的西林瓶放入 50mL 离心管中, 1000rpm 离心 1-2min。

生产企业的名称

北京同立海源生物科技有限公司

住所

北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 13 号楼 1 至 3 层

联系方式

400-010-5556

参考文献

1. Garnet Suck, Mickey Boon Chai Koh, Emerging natural killer cell immunotherapies: large-scale ex vivo production of highly potent anticancer effectors, Hematol Oncol Stem Cel Ther 2010; 3(3): 135-142 .
2. Malgorzata Grudzien and Andrzej Rapak, Review Article Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation Laboratory of Tumor Molecular Immunobiology, Ludwik Hirszfild Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wroclaw 53-114, Poland.

说明书编制

核准日期: 2026 年 03 月 23 日