

AMMS®高纯度 NK 试剂盒套装2.0 说明书

说明书编号: DS-Kit-R-AS26-A/0

产品名称

通用名称: AMMS®高纯度 NK 试剂盒套装 2.0

英文名称: AMMS® High Purity NK Cell Culture Kit 2.0

产品信息

套装货号: AS-26

套装组成:

高纯度 NK 添加因子 (货号: AS28-1)

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
高纯度 NK 添加因子	AS28-1	2mL	1 支	2-8℃	液体	18 个月

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	200μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 B-2.0	AS22-1B	500μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 C-2.0	AS22-1C	500μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 试剂 D-2.0	AS22-1D	500μL	1 支	-20℃	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℃, 避光保存	液体	18 个月

产品描述

本产品适用于新鲜外周血经高纯度 NK 添加因子分离获得的 PBMC, 经体外活化扩增获得 CD3-CD56+比例 > 95%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℃平放过夜
PBMC 分离	0 天	高纯度 NK 添加因子	/	/	/	/	获得 CD3-的 PBMC

种瓶	0 天	NK 试剂B-2.0	175cm ² 培养瓶	22.5mL	2.5mL	25mL	种瓶密度 1×10^6 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®高纯度 NK 试剂盒套装 2.0 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 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℃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℃灭活半小时，置于 4℃冰箱半小时，取出在室温下离心 10 分钟，取上清备用。
3. **配制稀释液。**DPBS+5%HSA（体积比）。
4. **稀释血细胞。**用等体积的稀释液稀释血细胞沉淀，稀释后混匀重悬，重悬后加入高纯度 NK 添加因子，添加比例 50uL/mL 样本初始量，加入后轻轻上下颠倒 5 次左右混匀，静置 20min，再用稀释液稀释后也同样颠倒混匀（稀释液添加比例不高于 1:1），此时不可吹打；
5. **分离 PBMC。**加到 Ficoll 层上使分层保持清晰，室温下离心 25 分钟。
6. **洗涤细胞。**吸取 PBMC 层，加生理盐水吹打混匀，室温下离心 8 分钟。再次洗涤细胞。
7. **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 1×10^6 个/mL。

8.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℃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 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 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（第 13 天）

用 2mL 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（第 14/15 天）

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

如需获得更多培养体积，可延长 NK 培养时间（可延长培养至 21 天，需额外采购 AMMS® NK 无血清培养基及 IL-2），继续补加 NK 完全培养基，补液后密度不低于 1×10^6 个/mL。

注意事项

1.血样要求:

①外周血 PBMC 需 2.5×10^7 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.种瓶密度: PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 1×10^6 个/mL, 样本状态差可适当提高铺瓶密度至 2×10^6 个/mL。

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, 建议一周左右使用完, 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。

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.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。

12.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。

13.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。

14.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 175cm² 的培养瓶, 细胞培养袋等。

15.PBMC 的收集: 因分血过程中白膜层仅收集了 CD3-的淋巴细胞, 收获的 PBMC 细胞量会比未添加高纯度 NK 因子的细胞数少 1/3-1/2。

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 Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wroclaw 53-114, Poland.

说明书编制

核准日期: 2025.05.29