

AMMS®高纯度 NK 试剂盒套装 3.0 说明书

说明书编号: DS-Kit-R-AS27-A/0

产品名称

通用名称: AMMS®高纯度 NK 试剂盒套装 3.0

英文名称: AMMS® High Purity NK Cell Culture Kit 3.0

产品信息

套装货号: AS-27

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 3.0-A/D (货号: AS25-1A/D)

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 激活添加剂 1	AS25-1C	1000μL	1 支	-20℃	液体	18 个月
NK 激活添加剂 2	AS25-1D	100μL	1 支	-20℃	液体	18 个月

AMMS® NK 细胞培养试剂盒 3.0-E/G (货号: AS25-1E/G)

试剂盒内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
NK 扩增添加剂 1	AS25-1E	1000μL	2 支	2-8℃	液体	18 个月
NK 扩增添加剂 2	AS25-1G	50μg	1 支	2-8℃	干粉	18 个月
重组人 IL-2 蛋白 (高效型)	TL-402-0100F	1×10 ⁶ IU	2 支	2-8℃	干粉	18 个月

AMMS® NK 激活培养基 (货号: AS25-2)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
AMMS® NK 激活培养基	AS25-2	100mL	1 瓶	2~8℃, 避光保存	液体	18 个月

AMMS® NK 扩增培养基 (货号: AS25-3)

产品内容	货号	规格	数量	保存条件	产品性状	效期
AMMS® NK 扩增培养基	AS25-3	1000mL	2 瓶	2~8℃, 避光保存	液体	18 个月

产品描述

本产品适用于冻存的经高纯度 NK 添加因子分离获得的外周血 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
PBMC 分离	/	高纯度 NK 添加因子	/	/	/	/	获得 CD3-的 PBMC 冻存
包被	-1 天	NK 试剂 A-2.0	75cm ² 培养瓶	/	/	/	包被瓶 4°C 平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B-2.0 NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	25mL	种瓶密度 1×10 ⁶ 个/mL
培养	3 天 (第 1 次补液)	NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	50mL	请勿吹打细胞，补加培养基不要碰到瓶底细胞层
	6 天 (第 2 次补液)	NK 完全激活培养基	75cm ² 培养瓶	23.75mL	1.25mL	75mL	
换瓶	7 天 (第 3 次补液)	NK 完全激活培养基 NK 完全扩增培养基	175cm ² 培养瓶	71.25mL	3.75mL	150mL	按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基（根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测），并加入 5% HPL (5% 自体血浆)。
装袋	9 天 (第 4 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	142.5mL	7.5mL	300mL	
	11 天 (第 5 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	285mL	剩余血浆	600mL	
	13 天 (第 6 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	600mL	/	1200mL	/
分袋	15 天 (第 7 次补液)	NK 完全扩增培养基	细胞培养袋	900mL	/	2100mL	/
收获	17/18 天	/	细胞培养袋	/	/	2100mL	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。

* 完全激活培养基的配置：每瓶 NK 激活培养基加入 1 支 NK 激活添加剂 1 和 1 支 NK 激活添加剂 2。

* 完全扩增培养基的配置：每瓶 NK 扩增培养基加入 1 支 NK 扩增添加剂 1、25ng/mL 的 NK 扩增添加剂 2 和 1 支重组人 IL-2 蛋白，IL-2 终浓度为 1000IU/mL

AMMS®高纯度 NK 试剂盒套装 3.0 参考操作方法:**PBMC 分离 PBMC 分离与冻存**

1. **分离血浆。**取少量血样（约 300 μ L）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-20°C 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 50 μ L/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，用生理盐水重悬细胞，吸取少量细胞计数。离心取上清，用细胞冻存液重悬细胞，调整细胞冻存密度 2×10^6 个/mL。
8. **细胞冻存。**细胞经梯度降温后放入液氮罐保存备用。

包被 细胞活化瓶预处理（第-1 天）

- 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 PBMC 复苏铺瓶与诱导（第 0 天）

1. **复苏 PBMC。**取冻存细胞在 37°C 水浴锅中迅速晃动直至冰晶消失。
2. **洗涤细胞。**将复苏的细胞加入生理盐水中，室温下离心 8 分钟。再次洗涤细胞。
3. **细胞计数。**弃上清，用少量完全激活培养基重悬细胞，吸取少量细胞计数。调整细胞密度 1×10^6 个/mL。
4. **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 1.25mL，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：* 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. **补液操作。**显微镜下观察细胞，瓶底细胞团达到瓶底面积的 20% 以上，按 25mL/瓶补加 NK 细胞完全激活培养基，并加入 5% 灭活血浆，培养终体积为 50mL。

注意：* 请勿吹打细胞！！

第二次补液（第 6 天）

2. **补液操作。**显微镜下观察细胞，细胞增殖较明显，中大团变多，按 25mL/瓶补加 NK 细胞完全激活培养基，并加入 5% 灭活血浆，培养终体积为 75mL。

注意：* 请勿吹打细胞！！

换瓶 第三次补液（第 7 天）

3. **补液换瓶操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基，将细胞悬液从 T75 瓶转移至 T175 瓶，按 75mL/瓶补加 NK 细胞完全扩增培养基（激活培养基使用完后补加扩增培养基），并加入 5% 灭活血浆，培养终体积为 150mL。

装袋 第四次补液（第 9 天）

4. **补液操作。**培养瓶中的细胞悬液转入细胞培养袋中，按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基，补加 150mLNK 细胞完全扩增培养基，5%灭活血浆，补液后终体积 300mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

第五次补液（第 11 天）

5. **补液操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基，补加 300mLNK 细胞完全扩增培养基，并加入剩余血浆，补液后终体积 600mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

第六次补液（第 13 天）

6. **补液操作。**按照细胞悬液与新鲜培养基体积比 1:1 补加 NK 细胞完全培养基，补加 600mLNK 细胞完全扩增培养基，补液后终体积 1200mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

分袋 第七次补液（第 15 天）

7. **分袋补液操作。**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 450mL 完全培养基。培养终体积 2100mL。根据需要进行细胞计数和 NK 细胞纯度检测，补液后密度不低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

收获（第 17/18 天）

正常情况下，第 17、18 天各收获 1050mL 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 扩增培养基及 AMMS® NK 细胞培养试剂盒 3.0-E/G），继续补加 NK 完全扩增培养基，补液后密度不低于 1×10^6 个/mL。

注意事项**1. 样本要求：**

冻存样本建议冻存密度 $2-4 \times 10^7$ 个/mL，复苏后活率不低于 80%。

2. **种瓶密度：**铺瓶的起始细胞密度建议 1×10^6 个/mL，红细胞较多时计数选择荧光计数或红细胞裂解后计数，以免影响细胞铺瓶密度。

3. **补液密度：**补液后密度不可低于 1×10^6 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时效较短，建议一周左右使用完。

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. **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）

8. **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。
9. **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。
10. **设备保养：**定期检查 CO2 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。
11. **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。
12. **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 75cm² 的培养瓶，细胞培养袋等。
13. **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.Umbilical Cord Blood Transplantation: Connecting Its Origin to Its Future.2023 Mar 3;12(2):55-71.
- 2.Natural Killer Cell Expansion and Cytotoxicity Differ Depending on the Culture Medium Used.2022 Nov 1;42(6):638-649.

说明书编制

核准日期：2025.05.29