

# CelCulSF™ NK Cell Culture Medium (Serum-free)

## NK 细胞无血清培养基

### 产品简介

CelCulSF™ NK Cell Culture Medium (Serum-free) 培养基是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清 (Serum-Free)、无异源动物源成分、使用药用级别原辅料的扩增培养试剂盒。NK 细胞无血清培养基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。

### 组分信息

组分编号	组分名称	40146ES84
40146-A	NK 细胞添加物 A	200 μL
40146-B	NK 细胞添加物 B	500 μL
40146-C	NK 细胞添加物 C	500 μL
40146-D	NK 细胞添加物 D	500 μL
40146-E	NK 细胞无血清基础培养基	1000 mL × 2 瓶

### 成分说明

纯因子法，药用级别原辅料，无血清培养，无需饲养细胞。

### 储存条件

NK 细胞无血清基础培养基，2~8°C，有效期 18 个月；

NK 细胞添加物，-20°C，有效期 18 个月。

### 使用说明

#### 1. 包被：细胞活化瓶预处理（第-1天）

40146-A 和 13 mL D-PBS 混匀，加入 175 cm<sup>2</sup> 培养瓶中，平放晃匀铺满，或 40146-A 和 9 mL D-PBS 混匀，加入 75 cm<sup>2</sup> 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。

#### 2. 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 300 μL）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 30 min，置于 4°C 冰箱 30 min，取出在室温下离心 10 min，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 min。
- 4) 洗涤细胞：吸取 PBMC 层，加生理盐水吹打混匀，室温下离心 5 min（脐血建议 8 min），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  $2 \times 10^6$  个/mL。
- 6) 种瓶：吸弃包被液，将细胞悬液中加入 40146-B，灭活血浆 2.5 mL，转入培养瓶内，培养终体积约 25 mL。剩余血浆 4°C 密封保存备用。

注：完全培养基的配置：每瓶培养基加入 1 支 IL-2，终浓度为 1000 IU/mL。包被瓶从冰箱取出的时间约为细胞加入前的 10 min。

#### 3. 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 40146-C 和 3.5 mL 灭活血浆，再加入约 46.5 mL 完全培养基，培养终体积为 75 mL。

注：请勿吹打细胞

#### 4. 培养 第二次补液（第 5 天）

加入 40146-D，和 8.75 mL 灭活血浆，再加入约 166.25 mL 完全培养基，培养终体积定容到 250 mL。

注：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。

#### 5. 装袋第三次补液（第 7 天）

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 350 mL 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 600 mL。

注：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。

#### 6. 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 300 mL 完全培养基。（培养终体积为 1200 mL）

#### 7. 第五次补液（第 11/12 天）

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

#### 8. 检验（第 13 天）

5 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。

#### 9. 收获（第 14/15 天）

正常情况下，第 14、15 天各收获 1000 mL 细胞悬液。

### 注意事项

#### 1. 血样要求

1) 外周血 PBMC  $> 3\times 10^7$  cells（推荐采血量 50 mL 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 14 mL），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。

2. **种瓶密度**：PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议  $2\times 10^6$  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  $0.6\times 10^6$  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. **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。

6. **包被时间**：40146-A 包被后需 4°C 平放过夜。

7. 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。

8. 本产品仅作科研用途。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。