

# AMMS<sup>®</sup> NK 试剂盒套装 2.0 说明书

说明书编号: DS-Kit-R-AS22-A/2

## 产品名称

通用名称: AMMS<sup>®</sup>NK 试剂盒套装 2.0英文名称: AMMS<sup>®</sup>NK Cell Culture Kit 2.0

## 产品信息

套装货号: AS-22

套装组成:

AMMS<sup>®</sup> 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°C	液体	18 个月
NK 试剂 B-2.0	AS22-1B	500μL	1 支	-20°C	液体	18 个月
NK 试剂 C-2.0	AS22-1C	500μL	1 支	-20°C	液体	18 个月
NK 试剂 D-2.0	AS22-1D	500μL	1 支	-20°C	液体	18 个月

AMMS<sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> NK 无血清培养基	AS01-2	1000mL	2 瓶	2~8°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 <sup>2</sup> 培养瓶	/	/	/	包被瓶4°C平放过夜
种瓶	0 天	NK 试剂 B-2.0	175cm <sup>2</sup> 培养瓶	22.5mL	2.5mL	25mL	种瓶密度2×10 <sup>6</sup> 个/mL
培养	3 天 (第 1 次补液)	NK 试剂 C-2.0	175cm <sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> 培养瓶	约 166.25mL	8.75mL	250mL	

<b>装袋</b>	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
<b>分袋</b>	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	
<b>收获</b>	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<sup>®</sup>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 175cm<sup>2</sup> 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 75cm<sup>2</sup> 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. **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  $2 \times 10^6$  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℃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 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（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  $1\times 10^6$  个/mL。

## 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  $2\times 10^6$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  平放过夜。（紧急情况下可尝试  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\text{CO}_2$  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  $175\text{cm}^2$  的培养瓶，细胞培养袋等。

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

#### 说明书编制

核准日期：2024 年 07 月 18 日

核准日期：2024 年 09 月 26 日