

**TBD**www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

高效 NK 细胞体外活化扩增试剂盒说明书

新鲜脐带血培养方案（2L-8L 体系）

【试剂材料清单】

▶ 试剂盒组份

产品货号：UCB2024GOLD

序号	名称	规格	保存温度
1	高效 NK-1	1 支	-20℃至-80℃ 避光保存
2	高效 NK-2	1 支	
3	高效 NK-3	1 支	
4	高效 NK-4	1 支	

▶ 配套试剂及耗材（根据实验需求自行选择搭配）

序号	名称	货号	规格	保存温度
1	样本密度分离液（医用级）	HY2015-100	100ml /瓶	RT
2	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L /瓶	2-8℃ 避光保存
3	PBS	PB2004Y	500ml /瓶	RT
4	PBMC 高效离心管（50ml）	601001	20 支/盒	RT
5	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	RT
6	细胞保存液	TBD798	100ml /瓶	2-8℃ 避光保存
7	高效 NK-3 (扩增体系必须因子, 单独采购)	UCB2024GOLD-NK-3	支	2-8℃ 避光保存

新鲜脐带血 CBMC 初始投入方案

脐带血中 NK 细胞 (CD3- 56+ 16+) 占淋巴细胞比例约为 3%-5% 之间, 其比例远远低于成年人外周血。而 NK 的细胞原始比例是体外培养的关键因素, 当 NK 细胞原始比例低于 5%, 会显著减缓体外活化及增殖速率。

一般 200ml 规格采血袋内含 28-30ml 抗凝剂, 建议采集脐带血量为 100ml 以上 (除去抗凝剂体积)。可获得 CBMC 约 2 亿-3 亿之间。

建议客户在实验开始前, 将采集的脐带血留出 1ml 进行流式检测, 记录 NK 细胞比例 (CD3- 56+ 16+)、细胞数量、细胞活率。并参照下表进行初始细胞投入。

样本	NK 细胞 (CD3-56+16+) 占淋巴细胞比例	细胞活率	投入 CBMC 总量 (单位: 个)	其中 NK 细胞 (CD3-56+16+) 数量 (单位: 个)
新鲜脐带血	3%-5%	90%-100%	6000 万 及以上	180 万 及以上
	(或无流式细胞仪)	80%-90%	8000 万 及以上	240 万 及以上

新鲜脐血差异影响 NK 细胞体外活化增殖的因素

1. **NK 细胞在新鲜脐带血中的原始比例:** 其占比越高增殖及活化效果越好;
2. **细胞活率:** 细胞活率越高增殖及活化效果越好;
3. **健康状况:** 未用药、无急慢性病产妇其培养效果佳;

长期用药、放化疗或使用过免疫系统类药物的人群培养结果波动性较大。

第一部分 培养瓶的包被

1. 取一个 T175 培养瓶(TC 处理培养瓶), 向瓶中加入 11ml 无菌 PBS 及一整支**高效 NK-1**, 请**充分摇匀后铺满整个瓶子底部**;
2. 将上述 T175 培养瓶拧紧瓶盖, 放入 37℃ 培养箱静置 2 小时, 或 4℃ 环境过夜静置 (约 12-20 小时);
3. 将包被好的培养瓶置于超净工作台内, 将瓶中的包被液直接倾倒弃去, **注意倾倒前不可来回摇晃包被液, 不要反复冲刷包被层, 不需要重复清洗瓶底, 请直接弃去包被液。** 此时 T175 培养瓶包被完成。

第二部分 培养基的配制

▷ 活化培养基的配制

1. 取 1 瓶免疫细胞无血清培养基 (产品货号: ANDL-TBD-G), 无菌分装出 500ml 置于无菌试剂瓶 (或 T175 及以上规格的细胞培养瓶中), 剩余 500ml 放置于 4℃ 环境下保存;
2. 向分装出的 500ml 免疫细胞无血清培养基中, 加入一整支**高效 NK-2**, 即为活化培养基。

▷ 增殖培养基的配制

1. 取出保存于 4℃ 环境中的 500ml 免疫细胞无血清培养基, 及另外一整瓶 1L 免疫细胞无血清培养基, 共计 1500ml;
2. 将 1500ml 免疫细胞无血清培养基, 平均分至两个试剂瓶中, 每瓶 750ml;
3. 取其中 1 瓶 750ml 免疫细胞无血清培养基, 加入 500ul **高效 NK-3** 摇匀即为增殖培养基。剩余 500ul 高效 NK-3 放置于 4℃ 环境下保存 (可保存 20 天左右)。使用时现用现配, 增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶 750ml 增殖培养基, 用完后再配制第二瓶 750ml 增殖培养基。

第三部分 脐带血采集

1. 临床获得健康新生儿脐带血 100ml 以上（不含抗凝剂）。（首选肝素钠抗凝剂）
2. 请保证血液在安全无菌且温度为 20-30℃ 条件下平稳运送至实验室。
3. 新鲜脐带血 CBMC 最佳分离时间为取血后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

操作释义：

1. 肝素钠抗凝剂的必要性：由于血浆中的纤维蛋白原活化成有活性的纤维蛋白，纤维蛋白交联成纤维蛋白血凝块，易使 CBMC 形成细胞团块，不利于细胞的活化。肝素钠抗凝剂可减轻上述情况发生几率。
2. 运输条件需保持常温状态（20℃-30℃），严禁冷藏冷冻运输及长期放置（4 小时以上），尽量平稳送至实验室，减少不必要的摇晃震动。低温、震荡或长期放置会导致红细胞破裂，血液理化性质发生改变，严重影响 CBMC 分离效果及细胞健康状态。



TBD

www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

高效 NK 细胞的活化及培养流程（2L 体系）

2L 体系培养建议客户采购以下配套试剂耗材：

序号	名称	货号	规格	建议采购数量
1	高效 NK 细胞体外活化扩增试剂盒	UCB2024GOLD	4 支/KIT	1KIT
2	样本密度分离液（医用级）	HY2015-100	100ml /瓶	1 瓶
3	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L /瓶	2 瓶
4	PBS	PB2004Y	500ml /瓶	1 瓶
5	PBMC 高效离心管（50ml）	601001	20 支/盒	1 盒
6	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	1 个
7	细胞保存液	TBD798	100ml /瓶	1 瓶

第 0 天：

1. 取出 2 支高效离心管，分别加入 16 ml 样本密度分离液，200g 离心 1min，确保离心后隔片下充满分离液，隔片上有 0.5-1cm 高度分离液。小心将 15-25ml 抗凝血缓慢沿管壁加至分离液界面上，确保血液与分离液之间有明显界面（每管可加 15-25ml 血液，若血量超过 25ml，则分管操作）。20-30℃ 环境下，离心力 600g，离心 30min（也可根据实际情况进行调节），注意离心机速度为慢升慢降。
2. 离心后可观察从上至下分为 4 层，淡黄色血浆层，白色环状 CBMC 层，分离液层，红细胞层。用吸管吸取最上层淡黄色血浆（每 50-60ml 抗凝脐带血约可获得 20-25ml 血浆），放置于无菌离心管中做灭活处理。

操作注意：

吸取血浆层时，吸管头请从上至下吸取，吸取至距离白色环状 CBMC 约 2mm 处时即可。如过分贴近 CBMC 层，可能造成 CBMC 的损失。

血浆的灭活步骤:

- ① 首先将含血浆的离心管置于水浴锅中 56℃ 静置 30min;
- ② 接着放置于-20℃环境下静置 10min;
- ③ 最后 1200g, 离心 15min;
- ④ 保存离心后的上清至一支新的无菌离心管中, 弃去底部沉淀;
- ⑤ 取出第 0 天所需 10ml 血浆备用;
- ⑥ 剩余血浆建议在第 3 天补液前进行 3 次-80℃ ~ 37℃环境的反复冻融; 3 次冻融后 1200g, 离心 15min; 弃去底部沉淀, 于 4℃保存离心后的灭活血浆。 (此步骤目的为尽量多的去除血浆中残留的纤维蛋白原, 客户可根据自身需求选择性进行。)

3. CBMC 洗涤: 用吸管吸取 CBMC 细胞层至 50ml 离心管中, 为尽量获得更多细胞, 建议隔片以上部分全部吸取, 注意不要吸到红细胞。在 CBMC 离心管中加入 PBS 混匀 (PBS 与 CBMC 体积至少为 1:1, 或加入的 PBS 体积大于 CBMC 体积), 600g, 离心 10min。弃去上清, 加入 PBS 重悬洗涤, 300g, 离心 10min。

操作注意:

细胞每一次洗涤都会有相应损失, 请客户酌情处理。离心有两种损失, 第一种是机械损伤细胞, 第二种是离心后上清液中有悬浮细胞。损失量约在 5%-15%之间, 建议第一次洗涤前进行细胞计数, 如细胞数量过少, 则酌情减少洗涤次数, 但至少洗涤 1 次。

4. 分离出的 CBMC 用**活化培养基** 配制成细胞悬液 **35ml**, 加入一整支“**高效 NK-4**”、加入 **10ml 灭活血浆**, 将上述所有液体转移至包被后的 T175 培养瓶中, 注意不要直接冲刷包被层, 请温和摇动液面至细胞液铺满整个培养瓶底部。置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂ 培养箱中培养 72 小时, 期间不要移动培养瓶。

操作注意：

1. 建议接种前计数，记录 CBMC 投入数量，以便后续实验步骤的分析调整；
2. 脐带血 CBMC 建议接种密度为 $1.5-3 \times 10^6$ 个/ml，如分离后细胞数少，则相对应减少培养基的量，但血浆及活化因子添加量不变；
3. 培养期间培养瓶盖需拧松至可透气且不掉落的狀態，约 0.5-1 圈（无论使用的是否为透气瓶，均拧松瓶盖。）
4. 建议使用纯度为 99.99% CO₂ 气体。

第 3 天：

加入 **40ml 活化培养基**，加入 **5ml 灭活血浆**。

第 5 天：

加入 **75ml 活化培养基**，加入 **5ml 灭活血浆**。

第 7 天：（开始计数）

将培养瓶中贴壁的细胞充分吹打下来，转移到 1 个细胞培养袋内（产品货号：N2500TBD）

加入 **5ml 灭活血浆**，视细胞生长状态（计数），建议向培养袋补加 **350ml 活化培养基**。

第 9 天：

视细胞生长状态（计数），建议向培养袋补加 **500ml 增殖培养基**，加入**剩余灭活血浆**。



TBD

www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

请客户于培养的第 7 天及后续补液日仔细阅读以下操作释义：

一. NK 细胞培养中判断补液的标准是周期还是浓度：

NK 培养一般来说是按照浓度进行补液，由于个体差异问题，每个样本生长状况不可能 100% 相同，按照天数来补液会有一些不准确，所以按照浓度是相对稳妥的。添加培养基的时间不一定要严格按照后期时间进行，根据具体情况具体分析，确保细胞已经活化成功，呈现聚团生长的情况，细胞数量有增殖。在补加培养基后，脐带血细胞密度至少维持在 $1-2 \times 10^6$ 个/ml，有利于细胞的生长。

二. 关于培养密度及何时补液的问题：

1. 脐带血 NK 细胞培养的最佳密度为 150 万个/ml~300 万个/ml。
2. 当细胞密度增殖到 200 万-300 万个/ml 之间，根据公式：当前细胞总量(单位个) \div 100 万个 - 现有体积 (ml) = 本次需补加培养基体积 (ml)，将补液后的细胞密度控制在 100-200 万个/ml。一般每隔 48 小时计数补液一次，直到培养基完全用光。
3. 如计数后发现当前细胞密度达不到 200 万个/ml，建议 48 小时后再计数，细胞状态不好或有凋亡现象，立即补加 5ml 灭活人脐带血血浆。

三. 关于 NK 细胞在培养过程中的结团问题：

1. 一般情况下，NK 细胞培养期间有结团现象是正常的，由于血浆中有不可避免纤维蛋白存在，容易造成细胞聚团或呈现絮状。经过反复吹打或摇晃可散开呈小团状为正常现象。
2. 使用的脐带血不够新鲜，有肉眼可见或不可见的凝血现象；
3. 密度过大，细胞在培养至第 11 天左右，细胞增殖速度达到峰值，DAY11-DAY13 左右容

易产生细胞絮状物，可稍用力来回摇晃培养袋数次至絮状物散开；

4. 染菌，细胞死亡，纤维相互交缠；
5. 未及时补液，细胞缺乏营养，死细胞抱团。

四. 为什么我的 NK 细胞长的慢甚至不长？

1. NK 细胞占淋巴细胞比例，若低于 5%，细胞呈缓慢生长或停滞增殖状态；
2. 供血人的身体情况是否健康，无急慢性病，无不良生活习惯，无特殊身体状况；
3. 血液新鲜度（以外周血离体 4 小时为判断，4 小时内为新鲜，4 小时以上为不新鲜）；
4. 试剂盒、培养液、分离液的保存温度各不相同，请放置在适宜环境下；
5. 脐带血 CBMC 投入密度需达标，至少为 150 万个/ml，推荐为 150 万-300 万个/ml 之间；
6. 补液时机准确，培养液呈现橘色，且计数达标后进行补液，过早或过多补液都会造成细胞不增殖或者少增殖；
7. 接种前 3 天，不要移动培养瓶；
8. 培养环境要稳定，温湿度适宜，CO₂ 气体纯度 99.99% 最佳，非必要不反复开关门。
9. 不论使用的是否为透气培养瓶，都要拧松瓶盖进行气体交换，只依靠透气膜的交换是远远不够的。

第 11 天：

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基 500ml**。



www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

第 13 天:

视细胞生长状态（计数），建议补加**增殖培养基 500ml**。此时取样做细菌、真菌、支原体、内毒素检测。

第 15 天:

收集 NK 细胞悬液 2000ml，400g×10min 离心后弃去上清液，250ml 离心管集 2 管每管生理盐水 200ml 洗涤（400g×10min）1 次，再用 50ml 离心管生理盐水 100ml 洗涤（400g×10min）1 次，按照 200ml 生理盐水+ 8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞，封装好后送至使用部门，同时留样封存以备日后检测。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读本试剂盒说明书，并严格按照说明书执行操作。
2. 本试剂盒必须按规定温度保存，不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻，并充分混匀，不可剧烈震荡。
3. 可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。



TBD

www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

高效 NK 细胞的活化及培养流程（扩增至 4L 体系）

扩增至 4L 体系培养，建议客户在 2L 体系试剂耗材基础上，加购以下试剂耗材：

序号	名称	货号	规格	建议采购数量
1	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L/瓶	2 瓶
2	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	1 个
3	高效 NK-3	UCB2024GOLD-NK-3	支	1 支

第一部分 扩增增殖培养基的配制

1. 扩增至 4L 体系，需在 2L 体系基础上，另行采购 2 瓶 1L 免疫细胞培养基（产品货号：ANDL-TBD-G）；
2. 取 1 瓶 1L 免疫细胞无血清培养基，加入 500ul **高效 NK-3** 摇匀即为扩增增殖培养基。剩余 500ul 高效 NK-3 放置于 4℃ 环境下保存（可保存 20 天左右）。使用时现用现配，扩增增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶扩增增殖培养基，用完后再配制第二瓶扩增增殖培养基。

第二部分 4L 体系扩增步骤

第 11 天：

无菌取培养袋内 500ml 细胞培养液，转移至另一细胞培养袋内。向两个培养袋内分别补加 500ml 扩增增殖培养基，补液后两袋总体积合计 2000ml。

第 13 天：

向 2 个培养袋内分别补加 1000ml 扩增增殖培养基，补液后每袋内含 2000ml 细胞悬液，2 袋总体积合计 4000ml。

第 16 天:

收集 NK 细胞悬液 4000ml, 400g×10min 离心后弃去上清液, 250ml 离心管集 2 管每管生理盐水 200ml 洗涤 (400g×10min) 1 次, 再用 50ml 离心管生理盐水 100ml 洗涤 (400g×10min) 1 次, 按照 200ml 生理盐水+ 8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞, 封装好后送至使用部门, 同时留样封存以备日后检测。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读本试剂盒说明书, 并严格按照说明书执行操作。
2. 本试剂盒必须按规定温度保存, 不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻, 并充分混匀, 不可剧烈震荡。
3. 可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。



TBD

www.tbdsience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

高效 NK 细胞的活化及培养流程（扩增至 8L 体系）

扩增至 8L 体系培养，建议客户在 2L 体系试剂耗材基础上，加购以下试剂耗材：

序号	名称	货号	规格	建议采购数量
1	免疫细胞培养基	ANDL-TBD-G	1L/瓶	6 瓶
2	2.5L 体系悬浮细胞培养袋	N2500TBD	个	3 个
3	高效 NK-3	UCB2024GOLD-NK-3	支	3 支

第一部分 扩增增殖培养基的配制

1. 扩增至 8L 体系，需在 2L 体系基础上，另行采购 6 瓶 1L 免疫细胞培养基（产品货号：ANDL-TBD-G）；
2. 取 1 瓶 1L 免疫细胞无血清培养基，加入 500ul **高效 NK-3** 摇匀即为扩增增殖培养基。剩余 500ul 高效 NK-3 放置于 4℃ 环境下保存（可保存 20 天左右）。使用时现用现配，扩增增殖培养基可在 4℃ 环境下保存 20 天左右。先使用第一瓶扩增增殖培养基，用完后再配制第二瓶、第三瓶、第四瓶、第五瓶、第六瓶扩增增殖培养基。

第二部分 8L 体系扩增步骤

第 11 天：

无菌取培养袋内 500ml 细胞培养液，转移至另一细胞培养袋内。向两个培养袋内分别补加 500ml 扩增增殖培养基，补液后两袋总体积合计 2000ml。

第 13 天：

向两个培养袋内分别补加 1000ml 扩增增殖培养基，补液后两袋总体积合计 4000ml。

第 15 天:

将两袋共计 4000ml 细胞培养液，平均转移至 4 个细胞培养袋内。向 4 个培养袋内分别补加 1000ml 扩增增殖培养基，补液后每袋内含 2000ml 细胞悬液，4 袋总体积合计 8000ml。

第 18 天:

收集 NK 细胞悬液 8000ml，400g×10min 离心后弃去上清液，250ml 离心管集 2 管每管生理盐水 200ml 洗涤(400g×10min)1 次，再用 50ml 离心管生理盐水 100ml 洗涤(400g×10min) 1 次，按照 200ml 生理盐水+ 8ml 20%人血清白蛋白重悬细胞，封装好后送至使用部门，同时留样封存以备日后检测。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读本试剂盒说明书，并严格按照说明书执行操作。
2. 本试剂盒必须按规定温度保存，不可反复冻融。试剂在使用前需常温解冻，并充分混匀，不可剧烈震荡。
3. 可视细胞生长的实际状况适当调整补液时间和用量。

如需继续扩增培养体系，可购买相应数量试剂耗材。