

# NK培养基KIT使用说明

## 一、NK培养基KIT产品组合：

NK 专用无血清培养基(Xeno-free)	货号：N116-1000
添加剂A (细胞生长因子)	货号：N116-A010
添加剂B (细胞生长添加剂)	货号：N116-G030
添加剂C (优化剂)	货号：N116-V025

## 二、培养基配置：

1) NK细胞培养A液准备：准备100mL NK细胞无血清培养基，将添加剂A全部加入到该培养基中，并加入终浓度2-3%的血浆，充分混匀后，备用。

2) NK细胞培养B液准备：准备900mL NK细胞无血清培养基，将添加剂B全部加入到该培养基中，并加入终浓度为2-3%的血浆培养至第14天或第21天。期间可根据细胞生长情况或需要，适时进行细胞计数，计算扩增倍数。

## 三、NK细胞的培养与扩增：

### Step 1. Day 0。

无菌采集脐带血（或外周血）20-50mL，肝素抗凝（注：去除贴壁细胞可提高NK细胞培养纯度）。常温低速离心收获血浆。将分离的人血浆置于56℃，30min灭活。冷冻血浆，常温解冻，1000rpm离心10min，去除沉淀物，获得的血浆用于NK细胞培养基制备（注：若采用冻存PBMC进行实验，需要预先准备人AB型血浆，并进行补体56℃，30min灭活后，用于NK细胞无血清培养基（A液和B液）的制备）。

用2倍量的生理盐水重悬去血浆后的外周血细胞。将该细胞悬液用Ficoll淋巴细胞分离液分离制备PBMC（收获的PBMC用生理盐水洗2遍），细胞计数。将细胞用NK细胞培养A液重悬细胞（约20ml），浓度至 $1-2 \times 10^6$ /ml，加入培养瓶中进行培养。

### Step 2. Day3。

观察细胞。细胞培养瓶中镜下可见微小细胞集落。将瓶中补加入倍量NK细胞无血清培养基B液，继续培养。

### Step 3. Day5。

观察细胞，并根据生长情况及时补加NK细胞无血清培养基B液，培养扩增NK细胞至第14天或第21天。期间可根据细胞生长情况或需要，适时进行细胞计数，计算扩增倍数。

### Step 4。

最后进行细胞表型分析。实验结束，收获细胞。荧光抗体（CD3、CD8、CD56）标记细胞，流式分析各群体细胞所占比例。

注：若在细胞扩增培养中后期（约10天左右）发现细胞增殖明显下降或停滞，可按每100mL NK细胞培养基加入25μL NK细胞优化剂后再进行培养优化。