Version 2，2026

CulLymNK-KIT03 使用说明书

【产品类型】：NK 细胞无血清培养试剂盒

【产品名称】：CulLymNK-KIT03

【产品货号】：CM-NKKIT03



【包装规格】：

试剂盒组分	型号	货号/规格	保存条件
NK 细胞无血清扩增培养基	MCM CulLymNK-SFM22（A）	CM022A-1000/1000mL×2	2～8℃
NK 细胞无血清激活培养基	MCM CulLymNK-SFM22（B）	CM022B-200/200mL	2～8℃
包被因子	NKMKIT03-01	NK-CF / 1.5mL	-20℃
激活因子	NKMKIT03-02	NK-AF / 1mL	-20℃
扩增因子	NKMKIT03-03	NK-EF / 1.5mL	-20℃
血清处理剂	NKMKIT03-04	NK-STR / 20mL	RT

【主要成分】：该产品为无血清培养基，不含动物源性成分。主要含糖类、氨基酸、无机盐、转铁蛋白、微量元素等。

【预期用途】：本品适用于人 NK 细胞体外高效扩增培养（适用于以肝素、枸橼酸钠等为抗凝剂的样本，也适用于冻存样本）。

【性能指标】：

无菌检测：阴性（细菌、真菌）	内毒素：<1EU/mL
pH：7.0～7.3（室温）	渗透压：280～350 mOsm/kg
外观：红色，澄清液体	

【运送要求】：

2～8℃，避光运送；

【储存条件及有效期】：

避光存储(存储温度参见【包装规格】)；有效期 12 个月。

【使用方法】：为获得最佳细胞培养扩增效果，请参考以下操作：

I. 准备作业

1. 培养瓶抗体包被

1.1.包被液配制：将 1.5mL 包被因子（NKMKIT03-01）与 6mL DPBS 充分混匀（1:4 混合）。

1.2.按下表标注量加入对应培养载体容器内，轻摇使包被液均匀铺满瓶底。之后水平放置于 4℃冰箱避光静置，包被 12～18h 后即可使用，包被完成后可存放一周。如紧急使用可在 37℃下静置，包被 2h 即可使用。

培养载体（TC处理）	包被液添加量
6孔板	**1.25mL**
25T培养瓶	**2.5mL**
75T培养瓶	**7.5mL**

注：培养瓶包被后建议尽快使用，以保证使用效果。

1.3.使用前吸出包被液，用 7mL DPBS 洗涤一次包被瓶。

注：洗涤包被瓶时，需把培养瓶竖起，从瓶底缓缓加入液体。不要吹打包被面，以免吹打对结合在瓶上的抗体造成损失。将培养基轻轻放倒，静置 2min 后轻轻晃动包被瓶对未结合的抗体进行洗脱，将洗涤液吸出。

II. 作业流程

Day 0，第 0 天

1. 样本血浆分离及灭活

1.1.开启水浴锅，温度设置为 56℃。

1.2.供者外周血 50mL（其中 10mL 用于血常规和传染病检测），将采集的血样转入 50mL 离心管。

1.3.700g 离心 10min（快升慢降）。

1.4.用移液器吸取上层淡黄色血浆于一个新的 50mL 离心管并标识。

1.5.将标识好的离心管用封口膜封口，加入 0.3mL（每 mL 血浆）的血清处理剂（NKMKIT03-04），放入 56℃水浴锅中，热灭活 30min。

1.6.灭活后即刻转入冷藏室（或碎冰）中冰浴 15～30min，2000g 离心 10min，吸取上清于新的离心管。

注：若为商业化人 AB 血清或商业化血清替代物，加入 0.3mL/mL 的血清处理剂（NKMKIT03-04），混匀，2000g 离心 10min，吸取上清于新的离心管。

2. PBMC 分离

2.1.用移液管将下层的血细胞与 DPBS（或其它平衡盐溶液）1:1 混匀，按 2:1（血细胞悬液：Ficoll）将血细胞悬液沿离心管管壁缓慢加入装有 Ficoll 的离心管内。

注：轻柔操作，勿打破 Ficoll 分界面。

2.2.将离心机升降速调至最低，500g 离心 30min。

2.3.离心结束后，用移液管吸取中间白膜层置于新的 50 mL 离心管，加入 40 mL DPBS（或其它平衡盐溶液）混匀，500g 离心 10min，洗涤两次，以去除血小板等杂质。最后一遍洗涤可选择使用 NK 细胞无血清扩增培养基，可提高细胞活率。

3. 特异性激活

3.1.将 NK 细胞无血清激活培养基预热至 37℃备用。

3.2.PBMC 前处理

3.2.1.贴壁处理（去除巨噬细胞等杂细胞以及恢复细胞状态）：

针对新鲜分离的 PBMC 及单采 PBMC 样本：建议使用 NK 细胞无血清激活培养基静置贴壁 2h，密度为 5×10^6/mL。

针对冻存的 PBMC 样本：建议使用 NK 细胞无血清激活培养基静置贴壁 5h。

3.2.2.贴壁处理后：

针对新鲜分离或冻存的 PBMC 样本：将细胞悬液收集至离心管，再用少量 NK 细胞无血清激活培养基吹打贴壁细胞（轻柔），收集细胞。

针对单采 PBMC 样本：将未贴壁的 PBL 收集到离心管后，用 DPBS（或其它平衡盐溶液）洗涤 2 次培养瓶，将所有细胞悬液一并收集至离心管中，500g 离心 10min 后，弃去上清。用 NK 细胞无血清激活培养基重悬 PBMC。

3.3.取样计数。将细胞悬液转移至抗体包被好的 T75 培养瓶中，根据细胞计数结果，补加 NK 细胞无血清激活培养基，外周血样本接种细胞密度控制为 1.5 ~ 2×10^6/mL（若为脐血样本，建议接种细胞密度控制为 2.5 ~ 3×10^6/mL），按照此时培养基的总体积补加激活因子（NKMKIT03-02）（培养基体积：

激活因子=1 mL：5 uL）。

3.4.添加终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

注：对于冻存的样本，可能会出现细胞团块（部分细胞死亡导致），接种细胞时注意勿吸取此团块。

4.NK 细胞**激活完全培养基**配制

4.1.打开 NK 细胞无血清激活培养基瓶盖，将剩余激活因子（NKMKIT03-02）全加入剩余 NK 细胞无血清激活培养基中配制成 NK 细胞激活完全培养基。

4.2.混合均匀，2～8℃避光保存备用。有效期 2 周，于保质期内使用。

Day 3，第 3 天

1. 将 NK 细胞激活完全培养基预热至 37℃。

2. 取出培养的 NK 细胞，根据细胞生长状态添加 1 ～ 2 倍体积的 NK 细胞激活完全培养基，添加终浓度 10%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

注：前 3 天培养体系内 NK 处于激活期，T 细胞逐步凋亡，细胞扩增不明显，镜下观察有较多细胞团。

Day 5，第 5 天

1. 将 NK 细胞激活完全培养基预热至 37℃。

2. 取出培养的 NK 细胞，混匀取样计数。按补液后密度 1.2～1.5×10^6/mL 计算，若补液体积超过 1 倍，则直接跳至步骤 6 处理。否则按以下步骤处理。

3. 将培养瓶内细胞悬液转移至 50mL 离心管，再用新鲜的 NK 细胞激活完全培养基轻轻冲洗培养瓶底部，以尽可能收集贴壁细胞。

4. 500g 离心 5min，去除上清液。

5. 用少量（5～10mL）NK 细胞激活完全培养基重悬，混匀取样计数。

6. 根据计数结果进行计算，补加 NK 细胞激活完全培养基，接种至新的 75T 或 175T 培养瓶继续培养，接种细胞密度控制为 1.2～1.5×10^6/mL，添加终浓度 5%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）

Day 7～D14/21

1. 按照每 1000mL NK 细胞无血清扩增培养基，加入 750uL 扩增因子（NKMKIT03-03）配制 NK 细胞扩增完全培养基。混合均匀，2～8℃避光保存备用。有效期 2 周，于保质期内使用。

2. 第 7 天，将 NK 细胞扩增完全培养基预热至 37℃。

3. 取出培养的 NK 细胞，显微观察及取样计数，补加 NK 细胞扩增完全培养基，接种细胞密度控制为

0.8×10^6/mL，添加终浓度 2%（Vol）已灭活自体血浆（或商业化人 AB 血清或商业化血清替代物）。

4. 之后每隔一天，取出培养的 NK 细胞，显微观察及取样计数，按照 0.8×10^6/mL 密度添加 NK 细胞扩增完全培养基继续培养。

注：如细胞扩增缓慢可根据需要添加不超过5%已灭活的自体血浆（或商业化人AB血清或商业化血清替代物）。

5. 培养至 D14，细胞总量一般能到达 2×10^9 以上，最长培养时间为 21 天，当细胞量到达需求量时，离心收获细胞，经检测合格后，按需求使用。

注：

□*细胞培养第 14 天，一般 $CD3^-$ $CD56^+$ >60%，扩增倍数>120 倍。*

细胞培养第 21 天，一般 $CD3^-$ $CD56^+$ >70%，扩增倍数>500 倍。

□ *由于不同样本存在差异，扩增及纯度情况存在差异，且部分样品培养 14 天以上会提前出现细胞老化及凋亡现象，建议根据实际情况选择培养时间，收获细胞。*

注：参考质量检测

检测项目	检测内容
无菌检测	最终品取样，检测细菌、真菌、支原体，均应呈阴性
内毒素检测	最终品取样，内毒素（<1EU/mL）
细胞存活率检测	最终品取样，活率>90%
表型分析	CD3、CD56、CD16（CD3-CD56+>50%，CD56+>60%，CD16+>60%）
细胞杀伤	检测效应细胞对肿瘤靶细胞的杀伤率

注：

①参考补液程序

由于样本存在差异，作业流程供参考，在培养过程中需根据培养情况进行适当调整。

时间	操作	培养耗材	补液体积（mL）	总体积（mL）	血清替代物比例	血清替代物量（mL）
D0	接种	T75	20	20	10%	2
D3	补液	T75	20	20	10%	2
D5	离心	2×T75	60	60	5%	3
D7	补液	2×T175	100	160	2%	2
D9	补液	3×T175	140	300	2%或不加	2.8
D11	补液	培养袋	200	500	2%或不加	4

D13	补液	培养袋	500	1000	/	/
D15	补液	培养袋	1000	2000	/	/
D16/17	收获	培养袋	/	/	/	/

【注意事项】：

1.本产品仅供进一步制造或研究使用。不适用于人或动物的诊断和治疗用途。

2.产品启封后应立即使用或分装保存，否则产品性能将受影响。培养基预热时，用多少取多少，禁止将整瓶培养基预温、禁止反复预温。

3.使用前应进行细胞培养测试，确认性能后再使用。

4.使用后产生的废弃物处理，应遵守使用者所在地相关法律法规要求，不得随意丢弃。

【说明书核准及修改日期】：2026 年 01 月

【技术支持】：

根据销售条款，如您遇任何问题，请与我公司技术人员联系：

Tel：+86 21-64909996-393 Fax：+86 21-64909996-730

Email：bioreagent@tofflon.com

Version 2，2026

附. 冻存PBMC的复苏操作

1. 材料

细胞培养基、水浴锅、15 mL无菌离心管；移液枪；15mL移液管；25mL移液管；自动移液器和无菌枪尖；室温离心机。

2. 步骤

2.1 预热细胞培养基。

2.2 迅速将细胞冻存管转移到37°C的水浴中（注意冻存管帽不可接触液面，否则易造成污染），解冻细胞，直到只剩下一个小冰晶（复苏时间控制在1~2min）。

3. *注：若细胞储存在液氮罐内，建议从液氮罐取出冻存管，将其放在超低温冰箱（-80 ℃）或干冰中3 ~ 5min，用来释放冻存管内残留液氮压力。*

2.3 缓慢加入0.5 ~ 1 mL细胞培养基到冻存管中，重悬细胞并将其从冻存管转移到15mL离心管中。用1mL细胞培养基冲洗冻存管，并将其转移到15mL离心管中。用细胞培养基补充至10mL。

2.4 400 × g离心10分钟。

2.5 丢弃上清，将细胞重悬于1mL细胞培养基中。

2.6 计数细胞并测定细胞存活率。

上海东富龙生物试剂有限公司 上海市闵行区都会路 139 号 http://bitec.tofflon.com 电话：+86 21-64909996-393 传真：+86 21-64909996-730