

# 新鲜血样来源 NK 细胞高效激活扩增培养

## 使用说明书 KIT03

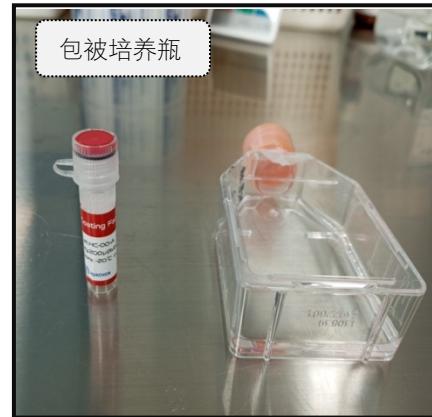
### 一、 实验前准备

- ① 耗材: T25 培养瓶 (TC treated) ; T75、T175培养瓶, 细胞培养袋, 移液管等;
- ② 试剂: DPBS, 生理盐水, Ficoll分离液, HCkit03 试剂盒
- ③ 设备: 迷你离心机, 大容量离心机, 水浴锅
- ④ 样本筛选: 如果需要大规模扩增NK细胞, 需要进行前期样本种子筛选。

外周血NK含量大于15%，脐带血采集量大于100ml，确保离体运输时间控制在8小时之内。  
如果做自体NK细胞培养，可以不参考样本筛选要求。

### 二、 d-1/d0天 包被培养瓶

- 取T25培养瓶一个，加入5ml DPBS，取Coating Factor Cocktail一支融解，融解后用瞬时离心机离心，以便减少粘壁损失，加入到DPBS中混匀，封口膜封口后置于4° C冰箱，静置包被16h以上，第二天使用；
- 或放置于37度培养箱2小时以上，快速包被；



### 三、 d0天NK细胞分离制备、激活

#### 准备工作:

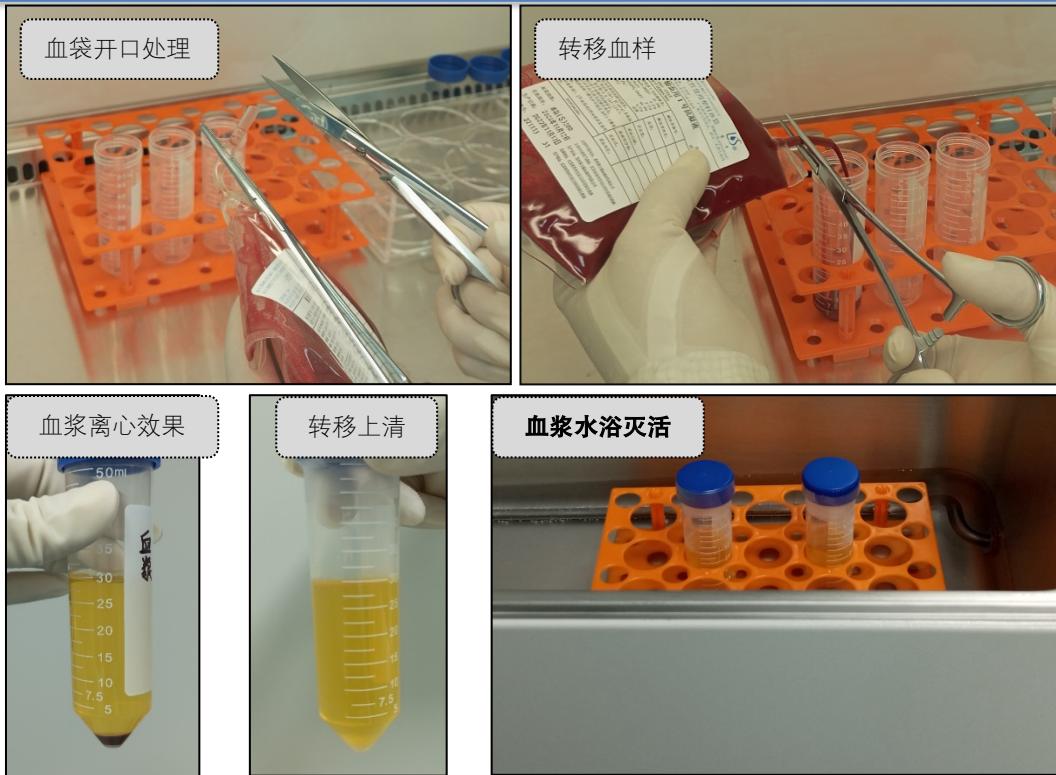
- ① 新鲜采集外周血或脐带血 40ml— 50ml；

注意：脐带血推荐采集总量>90ml（含28ml抗凝剂），只需要取50ml用于本体系培养，试剂盒只适配50ml起始血量。多余的可以Ficoll分离后冻存单个核细胞。

#### 分离制备自体灭活血浆：

- ① 离心：取抗凝血 50ml 转移到 50ml 离心管，全血以 1000g，离心 15 min 缓升 8 缓降 2；
- ② 灭活：水浴锅 56°C，30min 灭活血浆；
- ③ 离心备用：灭活后，置于-20°C存放 15min；再次离心 2100g，30min，取上层血浆至离心管，4°C保存备用。扩瓶培养使用前可以再次离心一次，去除沉淀。

如脐带血用于大量培养体系，为避免血小板污染和血浆的其他影响因素，则不使用自体血浆，直接用血小板裂解物替代。则血浆制备步骤跳过。

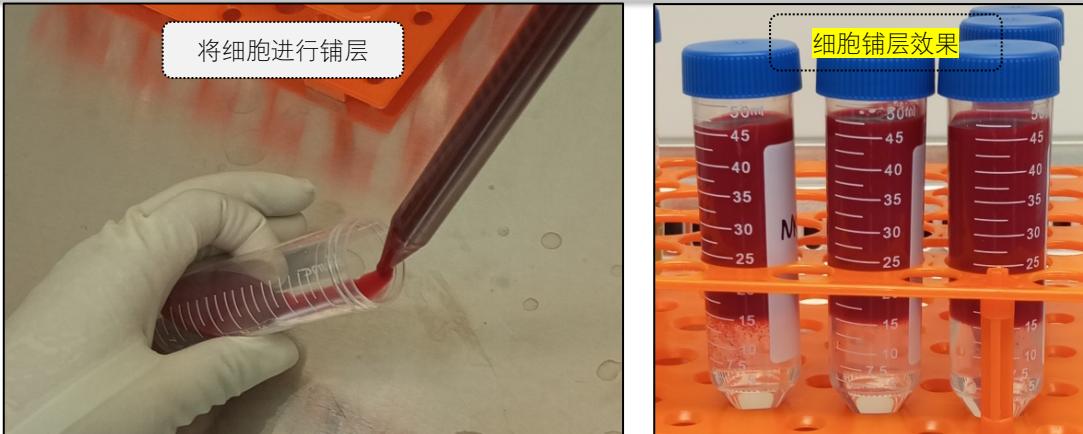


### 新鲜血样NK细胞分离纯化：

- 将血浆提取步骤中所得的下层细胞用生理盐水或DPBS稀释到45ml，轻轻吹打混匀（25ml移液管），加入一支 Purification Factor Cocktail，轻轻颠倒混匀，室温孵育20min后，用等量的生理盐水或DPBS重悬到90ml（分两个50ml离心管），轻轻颠倒混匀，不可吹打，防止吹打开已经形成的细胞团簇。
- 取50ml离心管，各加入15ml的Ficoll溶液，按照2:1的比例将血液小心加入到Ficoll铺层。
- 1200g离心20min，缓升缓降，缓升为1，缓降为0。

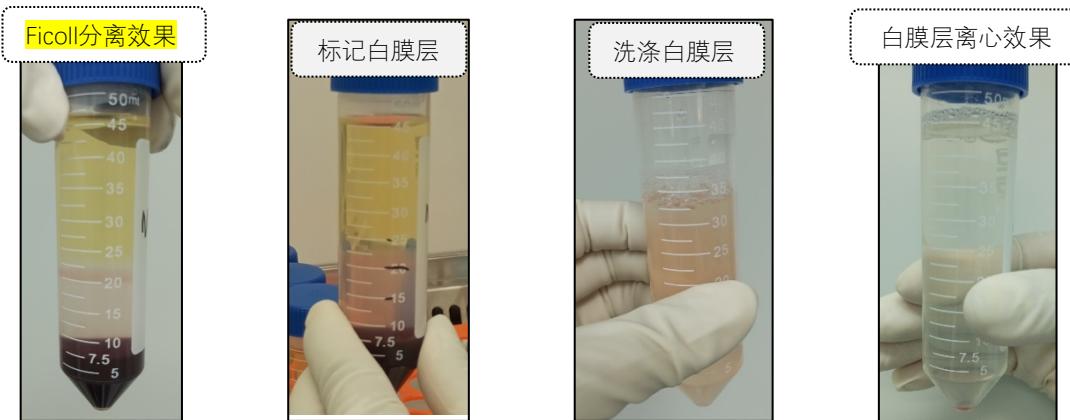
注：脐带血中含有较多未成熟红细胞，容易在Ficoll分离时离心不下来。建议50ml离心管加入20ml Ficoll，按照1:1的比例加入20ml稀释后的血液，离心。





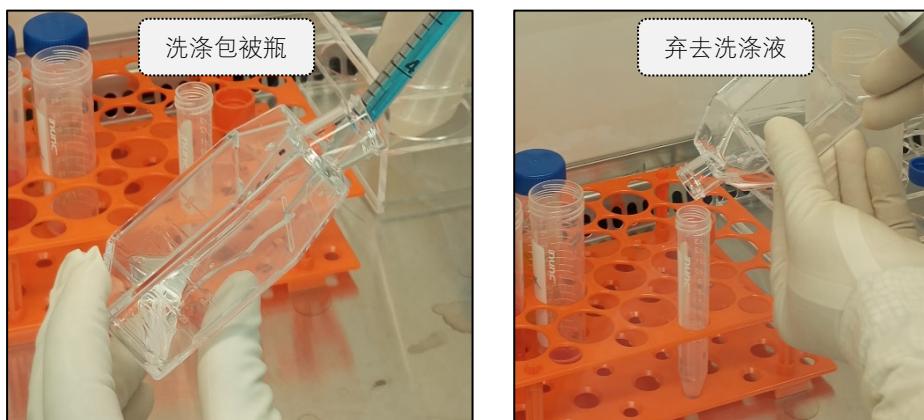
### NK细胞分离制备：

小心吸取白膜层到预加DPBS 20ml的50ml离心管，300g，离心10min（缓升8，缓降6）；弃上清，用10ml novaNK-20基础培养基重悬细胞，取样细胞计数。如供者血细胞中NK含量较少(如<5%) 则得到的白膜层细胞会较少，注意区分白膜层位置并标记，上下都多留多吸一些液体，可多吸一些Ficoll层，以尽可能多吸取细胞；



### 准备T25培养瓶：

取预先包被的T25培养瓶，倒掉包被液后用DPBS洗涤一次，弃去洗涤液备用。

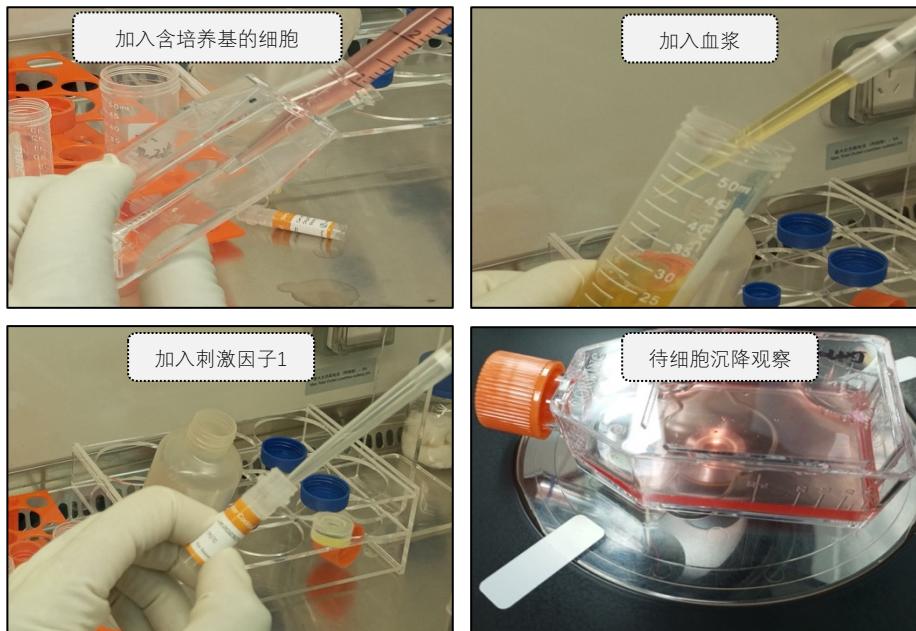


### NK细胞接种D0天激活

细胞总数量在2E6-2E7之间都统一加入10ml novaNK-20基础培养基，轻轻吹打混匀，加入10%灭

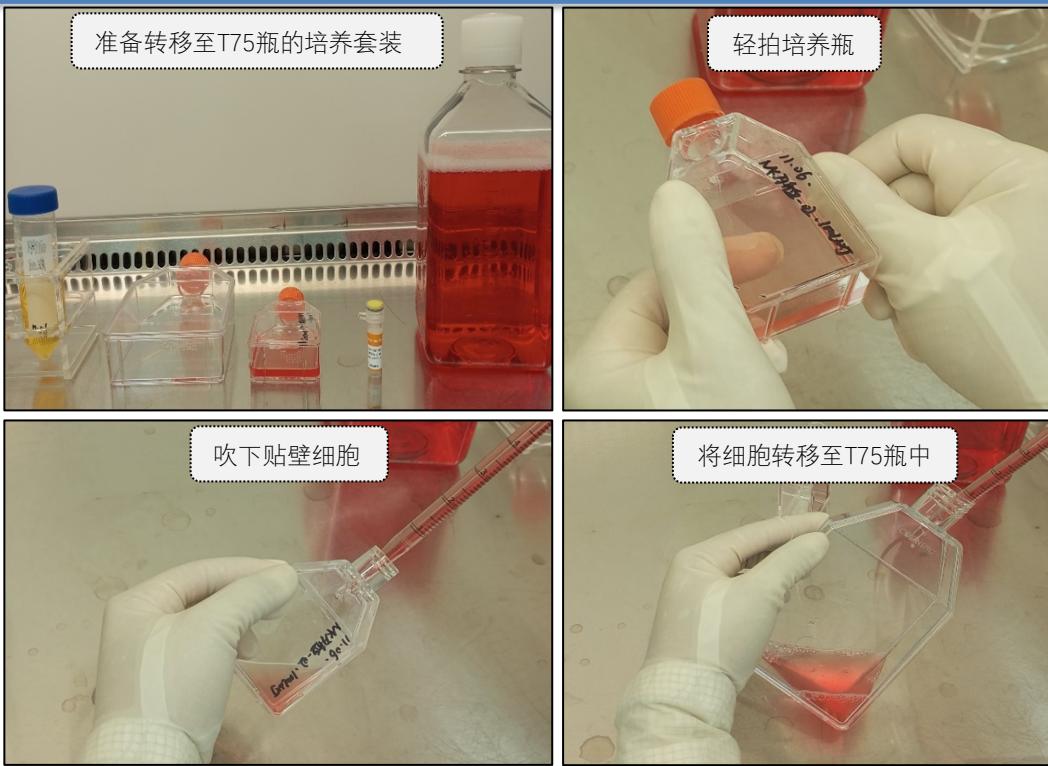
活自体血浆，加入一支 Stimulation Factor Cocktail 1。置于培养箱静置培养三天。3天内可不用进行观察以便细胞成团生长，如细胞量较多（大于1E7），则 d2 天观察以便确定是否可以扩瓶到 T75。

注：脐带血或者外周血如果Ficoll分离后细胞量比较多，则最多10ml初始培养基只需要接种最多2E7 的细胞，剩余多的细胞可以冻存起来，待后续使用。如果接种细胞数量过多，则需要及早进行扩瓶。



#### 四、 d3 扩瓶到 T75 并补液

- 适度轻轻吹散转移到 T75；
- 配制扩增用完全培养基：Basic Medium Supplement 20ml 用 37° C 水浴锅融解，添加到 1L novaNK-20 基础培养基，并加入一支 Expansion Factor Cocktail 和一支 Stimulation Factor Cocktail 2；形成扩增用完全培养基；
- T25 瓶中如有较多贴壁细胞，首先将细胞悬液转移到 T75 培养瓶后，拍打T25培养瓶瓶身，使其脱落（显微镜观察脱落情况），而用移液管很难吹打下来；确认脱落后，用20ml完全培养基洗涤T25瓶，加入到T75中，
- 10ml细胞悬液，加20ml新鲜培养基，加10%自体血浆2ml，T75瓶终体积为30ml。



## 五、d4 T75补液20ml

- 向T75培养瓶中加入20ml新鲜完全培养基，并补加10%自体血浆 2ml。

## 六、d5 转移到T175并补液

- 适度轻轻吹散转移到 T175；
- 50ml细胞悬液，加50ml新鲜完全培养基，加5%自体血浆2.5ml，T175瓶终体积为100ml。

## 七、d6 T175补液50ml

- 适度轻轻吹散大的细胞团块；
- 100ml细胞悬液，加50ml新鲜完全培养基，加5%自体血浆2.5ml，T175瓶终体积为150ml。

## 八、d7 转移到培养袋

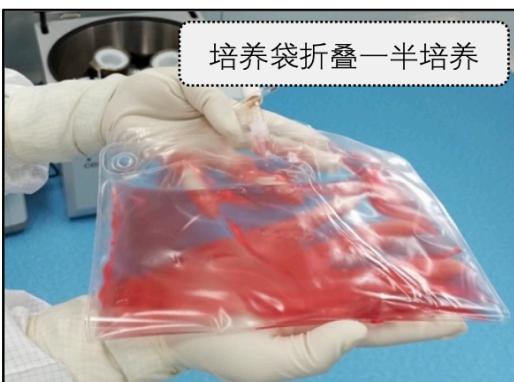
- 适度轻轻吹散大的细胞团块，并转移到细胞培养袋中；
- 150ml细胞悬液，加150ml新鲜完全培养基，加2%自体血浆3ml，培养袋终体积为300ml；
- 培养袋折叠三分之一培养。



注：如果需要千亿级大规模培养 NK 细胞，推荐先用细胞培养瓶 T175 进行扩瓶培养，扩瓶后再一对一入袋培养。

### 九、d9 培养袋等量补液300ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 300ml细胞悬液，加300ml新鲜完全培养基，加2%自体血浆6ml，培养袋终体积为600ml；
- 如自体血浆用完可以不再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；
- 培养袋折叠一半培养。



### 十、d11 培养袋等量补液600ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 600ml细胞悬液，加600ml新鲜完全培养基，培养袋终体积为1200ml；
- 如自体血浆用完可以不用再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；
- 培养袋打开培养。

## 十一、d13 培养袋补液600ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 1200ml细胞悬液，加600ml新鲜完全培养基，培养袋终体积为1800ml，最多到2L；
- 如自体血浆用完可以不用再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；

## 十二、d15/d16 细胞收获

- 最后一次补液间隔一天至两天，细胞密度大于3E6/ml或者更高密度，进行细胞收获。
- 如需放大培养则隔天进行1:1扩袋，如自体细胞需要回输，则择机可以收获细胞。
- 如需收获细胞则充分拍打细胞培养袋，使贴壁细胞脱落；
- 计数并进行流式检测，杀伤实验等后续应用；
- 收获计数时建议采用AOPI染色计数，细胞计数仪对于成熟杆状的 NK 细胞容易漏计；
- 为获得更多的细胞数量，最后一次补液后可以隔两天再进行细胞收获。

## 十四、如需继续大规模培养

- 脐带血不建议用自体血浆，全程用血替代替，如果要大量培养整个培养过程都建议后期维持1-2%的血替添加量。
- 如果要测试长期扩增效果，可以从d14天之后，取75ml细胞悬液到T175培养瓶模拟长时间大规模培养的效果，进行换算得到d28天的数据。
- d20天前入袋，隔天补液细胞密度调整至补液后1-1.2E6；d20天之后间隔2天补液一次，或细胞密度调整至补液后1.3-1.5E6
- 根据细胞需求量，可以持续培养到d28天。自d18天之后到d28天，每天可以根据客户细胞需求情况决定是否部分收获细胞，满足客户即时需求，无需等待。
- 补液前需要计数，使得补液后细胞密度不低于1E6/ml。视细胞增殖状况进行补液，一般等量补液，细胞增殖旺盛也可以双倍补液。
- 如果要培养多袋细胞，则先各扩增到T175或225培养瓶，然后再各自入袋培养。如果细胞数量少，可以延迟一到两天扩袋，务必使扩袋前培养瓶中细胞数量较多。