

hyperClone® Human Cryopreserved Mononuclear Cells NK Activation/Expansion Cocktail

冻存单个核细胞来源 NK 细胞激活扩增说明书 KIT02

一、 实验前准备

- ① 耗材：T75 (TC treated)、T175 培养瓶，细胞培养袋等耗材；
- ② 试剂：DPBS, novaNK-20 培养基 (4 度保存), kit02 试剂盒 (-20 度保存)
- ③ 设备：迷你离心机，大容量离心机，水浴锅，培养箱等；
- ④ 冻存的 PBMC 或 CBMC 细胞，共 4-6E7 细胞；

二、 d0 天复苏接种实验

包被培养瓶：

- 取 T75 培养瓶一个，加入 10ml DPBS，取 400 μ l 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；

复苏冻存的 PBMC/CBMC：

- 取 30ml novaNK-20 基础培养基到 50ml 离心管，放置在 37°C 水浴锅预热后使用；
- 取 4-6E7 冻存的 PBMC 或 CBMC，水浴锅解冻复苏，注意解冻最后留一小冰晶，1ml 移液枪轻轻吸取复苏液，勿吹打，转移到预热的的基础培养基中，800rpm，8min 离心，缓升 8 缓降 6；
- 弃上清，20ml novaNK-20 基础培养基重悬细胞。加 20%血小板裂解物 4ml, 400 μ l Stimulation Factor Cocktail 1 一支, 200 μ l Stimulation Factor Cocktail 2 一支；

细胞接种：

- 包被好的 T75 培养瓶，弃去包被液备用，
- 将前步骤细胞悬液转移到 T75 培养瓶，加入时不要冲刷包被面；
- 置于 37°C 二氧化碳培养箱静置培养 3-4 天；

三、 d4 T75 补液 30ml

- d4，显微镜观察细胞状态，如细胞密度较高有中等以上细胞团块较多，则进行等量补液激活培养基。注意培养基颜色千万不可变的太黄，培养基颜色微黄时需要及时补液；

- 配制激活培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 Expansion Factor Cocktail 和一支 Stimulation Factor Cocktail 3。
- 激活培养基 1L 用完后用完全培养基。
完全培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 Expansion Factor Cocktail 。
- 20ml 细胞悬液，加入 30ml 激活培养基，补加 10%血小板裂解物 3ml，T75 瓶终体积 50ml；

四、 d5 转移到 T175 补液 50ml

- 适度轻轻吹散转移到 T175；
- 50ml细胞悬液，加50ml激活培养基，加5%血小板裂解物2.5ml，T175瓶终体积为100ml。

五、 d6 T175补液50ml

- 适度轻轻吹散大的细胞团块；
- 100ml细胞悬液，加50ml激活培养基，加5%血小板裂解物2.5ml，T175瓶终体积为150ml。

六、 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激活培养基，加2%血小板裂解物3ml，培养袋终体积为300ml；
- 培养袋折叠三分之一培养。

七、 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激活培养基，加1%血小板裂解物3ml，培养袋终体积为600ml；
- 培养袋折叠一半培养。

八、 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新鲜培养基（激活培养基用完后加完全培养基），培养袋终体积为1200ml；
- 培养袋打开培养。

九、 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；

十、 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，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。
- 以后隔天用培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6/ml$ ，适时进行扩瓶，扩瓶时细胞融合度要大于 80%。
- 视细胞增殖状况进行补液和扩瓶，一般等量补液，细胞增殖旺盛也可以双倍补液。
- 补液后第二天显微镜下观察细胞密度和培养基颜色，如果培养基颜色已变微黄，细胞团块和数量也较多，可以继续补液培养；如果培养基颜色较红，并且细胞数量和团块也不是很多，可以间隔一天，等细胞数量上来了，再补液培养；
- 培养基需要预温到室温，不可反复 37 度预热。当细胞扩增到一定数量可启动回输。