



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  $\mu$ 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  $\mu$ l Stimulation Factor Cocktail 1 一支, 200  $\mu$ 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。